



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas



**Lietuvos sveikatos mokslų universitetas**  
Farmacijos fakultetas

**Balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų  
perdirbimas į vertingus funkcionaliuosius komponentus  
optimizuojant ekstrakcijos aukšto slėgio tirpikliais procesą**  
Baigiamasis magistro projektas

---

**Greta Kvietkutė**  
Projekto autorė

**Doc. dr. Vaida Kitrytė**  
Vadovė

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**  
Cheminės technologijos fakultetas

**Lietuvos sveikatos mokslų universitetas**  
Farmacijos fakultetas

**Balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų  
perdirbimas į vertingus funkcionaliuosius komponentus  
optimizuojant ekstrakcijos aukšto slėgio tirpikliais procesą**

Baigiamasis magistro projektas

Medicininė chemija (6281CX001)

---

**Greta Kvietkutė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Vaida Kitrytė**

Vadovė

**Doc. dr. Rimgailė Degutytė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2021**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Lietuvos sveikatos mokslų universitetas**

Farmacijos fakultetas

Greta Kvietkutė

## **Balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų perdirbimas į vertingus funkcionaliuosius komponentus optimizuojant ekstrakcijos aukšto slėgio tirpikliais procesą**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto ir Lietuvos sveikatos mokslų universiteto teisės aktų, reglamentuojančių akademinę etiką, intelektinės nuosavybės teises, jų valdymą ir perdavimą;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Kauno technologijos universitete ir (ar) Lietuvos sveikatos mokslų universitete galiojančią tvarką ir mano studijų sutartis bus nutraukta, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai dėl galimo akademinės etikos pažeidimo.

Greta Kvietkutė

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Kvietkutė, Greta. Balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų perdirbimas į vertingus funkcionaliuosius komponentus optimizuojant ekstrakcijos aukšto slėgio tirpikliais procesą. Baigiamasis magistro projektas / vadovė doc. dr. Vaida Kitrytė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: balzaminių tuopų pumpurai; ekstrakcija padidintame slėgyje; optimizavimas; fitocheminė sudėtis; *in vitro* antioksidacinis aktyvumas; antimikrobinis aktyvumas; tirozinazės inhibicijos geba.

Kaunas, 2021. 70 p.

## Santrauka

Balzaminių tuopų (*P. balsamifera* L.) pumpurai tradicinėje medicinoje yra vertinami dėl plataus terapeutinio poveikio. Tuopų pumpurai bei jų produktai (ekstraktai, ištraukos ir kt.) gali būti naudojami kaip antibakteriniai, priešgrybeliniai, priešušdegiminiai, karščiavimą mažinantys ir greitinantys žaizdų gijimą preparatai. Dėl vertingų bioaktyvių junginių (pvz., pinocembrinas, pinostrobinas, kavos rūgštis, ferulio rūgštis, balzakonai ir kt.) gausos įvairūs tuopų pumpurų ekstraktai gali būti pritaikyti maisto papildų, kosmetikos ir farmacijos pramonėje. Dėl šių priežasčių efektyvių ekstrakcijos bei frakcionavimo procesų, skirtų bioaktyviems tuopų junginiams išskirti, kūrimas ir taikymas yra vienas svarbiausių uždavinių siekiant racionaliai perdirbti šią augalinę žaliavą į aukštesnės pridėtinės vertės komponentus.

Šio darbo tikslas – optimizuoti Lietuvoje augančių balzaminių tuopų (*P. balsamifera*) pumpurų ekstrakcijos aukšto slėgio netoksiškais, aplinkai ir žmogui draugiškais tirpikliais (EtOH ir H<sub>2</sub>O) procesus siekiant šią augalinės kilmės žaliavą perdirbti į aukštesnės pridėtinės vertės funkcionaliuosius komponentus. Šiam tikslui pasiekti ekstrakcijos padidintame slėgyje (EPS-EtOH) parametrai (temperatūra ir laikas) buvo optimizuoti taikant atsako-paviršiaus metodologiją. Ekstrakcijos sąlygos: 40–80 °C temperatūra, 15–45 min laikas (3 ciklai po 5–15 min). Nustatyta, jog atliekant EPS-EtOH 78 °C temperatūroje 18 min, galima išgauti didžiausią bendrą ekstrakto (53,5 g/100 g TP), *in vitro* antioksidacine geba pasižyminčių junginių (BFKJ – 79,7 mg GRE/g TP, TEAG<sub>ORAC</sub> – 1459,9 mg TE/g TP, TEAG<sub>ABTS</sub> – 530,9 mg TE/g TP) ir tikslinių junginių (pinocembrino kiekis – 27,3 mg/g TP, pinostrobinas – 7,0 mg/g TP) kiekį. Optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis buvo pasiekta didžiausia karotinoidų išeiga (107,4 µg/g TP) ir sumažintas nepageidaujama žalia spalva ekstraktams suteikiančių chlorofilų kiekis. Angliavandeniliniai seskviterpenai α-murolenas (8,6 %), γ-kurkumenas (7,3 %), β-kurkumenas (4,4 %) ir trans-α-bergamotenas (3,6 %) buvo pagrindiniai identifikuoti lakieji junginiai, suteikiantys EPS-EtOH ekstraktui medienos, prieskonių, balzamo ir žolelių tipo aromatą. Tuopų pumpurų liekana po optimizuoto EPS-EtOH buvo toliau ekstrahuojama subkrižiniu vandeniu (EPS-H<sub>2</sub>O) ir optimaliomis sąlygomis (110 °C, 15 min) buvo papildomai išskirta 6,9 g/100 g TP polinių komponentų, TEAG<sub>ORAC</sub> siekė 71,2 mg TE/g TP, o TEAG<sub>ABTS</sub> – 38,5 mg TE/g TP. *P. balsamifera* pumpurų liekanoje nustatyta 0,2 mg/g TP pinocembrino, o pinostrobinas neaptikta. EPS-EtOH ekstraktas buvo efektyvus prieš gramteigiamas *Staphylococcus aureus* bakterijas bei slopino *Candida albicans* mielių augimą, o EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktas pasižymėjo antimikrobinio poveikiu tik prieš *Staphylococcus aureus* gramteigiamas bakterijas. Balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH ekstraktas, išgautas optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis, efektyviai slopino tirozinazės aktyvumą (108,2 mg KRE/g TP).

Kvietkute, Greta. Processing of Balsam Poplar (*Populus balsamifera* L.) Buds into Valuable Functional Components by Optimizing Pressurized Liquid Extraction Process. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. Vaida Kitrytė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: balsam poplar buds; accelerated solvent extraction; optimization; phytochemical composition; in vitro antioxidant activity; antimicrobial activity; tyrosinase inhibition capacity.

Kaunas, 2021. 70 pages.

### Summary

Buds of balsam poplar (*P. balsamifera* L.) are valued in traditional medicine for their wide therapeutic effect. Poplar buds and their products can be used as antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antipyretic and accelerating wound healing preparations. Due to the abundance of valuable bioactive compounds (e.g. pinocembrin, pinostrobin, caffeic acid, ferulic acid, balsacones, etc.), various poplar bud extracts can be applied in the food supplement, cosmetics and pharmaceutical industries. For these reasons, the development and application of efficient extraction and fractionation processes for the extraction of bioactive poplar compounds is one of the most important tasks in order to rationally process this plant raw material into higher value-added components.

The aim of this work – to optimize the extraction processes of balsam poplar (*P. balsamifera* L.) buds growing in Lithuania with high pressure non-toxic, environmentally and human-friendly solvents (EtOH and H<sub>2</sub>O) in order to process this plant raw material into higher value-added functional components. To achieve this goal, the parameters (temperature and time) of extraction under elevated pressure (EPS-EtOH) were optimized using a response-surface methodology. Extraction conditions were: 40–80 °C temperature and 15–45 minutes extraction time (3 cycles of 5–15 minutes). EPS-EtOH at 78 °C for 18 minutes was found to yield the highest total amount of extract (53,5 g/100 g) and *in vitro* antioxidant compounds (TPC – 79,7 mg GAE/g PB, TEAC<sub>ORAC</sub> – 1459,9 mg TE/g PB, TEAC<sub>ABTS</sub> – 530,9 mg TE/g PB) and target compounds (pinocembrin content – 27,3 mg/g PB, pinostrobin content 7,0 mg/g PB) content. Under optimal extraction conditions, the highest yield of carotenoids (107,4 µg/g) was achieved and the amount of chlorophylls giving undesirable green color to the extracts was reduced. The hydrocarbon sesquiterpenes  $\alpha$ -muurolene (8,6 %),  $\gamma$ -curcumene (7,3 %),  $\beta$ -curcumene (4,4 %) and trans- $\alpha$ -bergamotene (3,6 %) were the main volatile compounds identified to give ethanol extract aroma of wood, spices, balsam and herbs. The residue of poplar buds after optimized EPS-EtOH was further extracted with subcritical water (EPS-H<sub>2</sub>O) under optimal conditions (110 °C, 15 min) and 6,9 g/100 g PB of polar components were additionally isolated, TEAC<sub>ORAC</sub> reached 71,2 mg TE/g PB, TEAC<sub>ABTS</sub> – 38,5 mg TE/g PB. 0,2 mg/g PB of pinocembrin was detected in *P. balsamifera* buds residue and no pinostrobin was detected. EPS-EtOH extract was found to be effective against gram-positive *Staphylococcus aureus* bacteria and inhibited the growth of *Candida albicans* yeast, while EPS-H<sub>2</sub>O extract had antimicrobial activity only against *Staphylococcus aureus* gram-positive bacteria. EPS-EtOH extract of balsam poplar buds obtained under optimal extraction conditions, effectively inhibited tyrosinase activity (108,2 mg KAE/g PB).

## Turinys

<b>Lentelių sąrašas</b> .....	<b>8</b>
<b>Paveikslų sąrašas</b> .....	<b>9</b>
<b>Santrumpų sąrašas</b> .....	<b>10</b>
<b>Įvadas</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Literatūros apžvalga</b> .....	<b>13</b>
1.1. Tuopų bendroji charakteristika, morfologiniai požymiai ir fitocheminė sudėtis .....	13
1.2. Tuopų pumpurų poliniai bioaktyvieji junginiai .....	15
1.2.1. Flavonoidai .....	16
1.2.2. Fenolinės rūgštys .....	17
1.2.3. Balzakai .....	18
1.3. Tuopų pumpurų savybės .....	18
1.4. Polinių junginių ekstrakcijos būdai ir proceso optimizavimas .....	20
1.5. Tuopų preparatų panaudojimas .....	26
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai</b> .....	<b>27</b>
2.1. Balzaminių tuopų pumpurai .....	27
2.2. Naudotos medžiagos .....	27
2.3. Balzaminių tuopų pumpurų ekstrakcija padidintame slėgyje (EPS).....	27
2.4. <i>P. balsamifera</i> pumpurų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimai .....	28
2.4.1. Deguonies radikalų sujungimo gebos nustatymas (ORAC).....	28
2.4.2. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas (BFJK) .....	29
2.4.3. ABTS <sup>•+</sup> laisvųjų radikalų surišimo metodas.....	30
2.5. Antimikrobinio aktyvumo nustatymas .....	30
2.6. Tirozinazės inhibicijos gebos aktyvumas .....	31
2.7. Pinocembrino ir pinostrobinio analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.....	31
2.8. Chlorofilų a ir b bei bendro karotinoidų kiekio nustatymas .....	32
2.9. Lakiųjų junginių analizė.....	32
2.10. <i>P. balsamifera</i> EPS-EtOH eksperimentinio plano sudarymas ir proceso optimizavimas .....	33
2.11. Statistinė analizė.....	34
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas</b> .....	<b>35</b>
3.1. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH sąlygų optimizavimas.....	35
3.1.1. Centriškai kompozicinis planas ir modelio analizė .....	37
3.1.2. Atsako-paviršiaus grafikų analizė .....	43
3.1.3. Optimalių proceso sąlygų nustatymas ir ekstraktų charakterizavimas.....	47
3.2. <i>P. balsamifera</i> EPS-EtOH ekstraktų viršerdvės lakiųjų junginių analizė.....	50
3.3. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-H <sub>2</sub> O sąlygų optimizavimas .....	52
3.4. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H <sub>2</sub> O ekstraktų antimikrobinio aktyvumo nustatymas .....	54
3.5. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H <sub>2</sub> O ekstraktų tirozinazės inhibicijos gebos nustatymas .....	57
<b>Išvados</b> .....	<b>60</b>
<b>Literatūros sąrašas</b> .....	<b>61</b>
<b>Publikacijų sąrašas</b>	
<b>Priedai</b>	

- 1 priedas. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH temperatūros ir laiko įtaka bendram ekstraktų fenolinių junginių kiekiui, in vitro deguonies radikalų sujungimo gebai, pigmentų (karotinoidų ir chlorofilų) bei tikslinių fenolinių junginių (pinocembrino ir pinostrobinio) kiekiams
- 2 priedas. Centriškai kompozicinių *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH modelių dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes
- 3 priedas. Koreliacijos matrica tarp *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH priklausomų kintamųjų verčių, išreikštų gramams tuopų pumpurų
- 4 priedas. Koreliacijos matrica tarp *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH tarp priklausomų kintamųjų verčių, išreikštų gramui ekstrakto
- 5 priedas. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto (78 °C, 18 min) priklausomų kintamųjų verčių atitikimas modeliui
- 6 priedas. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto (78 °C, 18 min) viršerdvės lakiųjų junginių kokybinė ir kiekybinė sudėtis

## Lentelių sąrašas

1 lentelė. Tuopų pumpurams būdingos savybės.....	19
2 lentelė. Ekstrakcijos metodai taikomi ekstrahuojant tuopų anatomines dalis .....	22
3 lentelė. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH optimizavimo eksperimentinis planas .....	33
4 lentelė. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH temperatūros ir laiko įtaka ekstraktų išeigai, bendram fenolinių junginių kiekiui, in vitro deguonies radikalų sujungimo gebai, pigmentų (karotinoidų ir chlorofilų) bei tikslinių fenolinių junginių (pinocembrino ir pinostrobino) kiekiams .....	38
5 lentelė. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH priklausomų kintamųjų modelių regresinė analizė..	40
6 lentelė. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH ekstrakto, išgauto optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis, priklausomų kintamųjų vertės .....	48
7 lentelė. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-H <sub>2</sub> O ekstraktų nustatytos priklausomų kintamųjų vertės...	53
8 lentelė. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H <sub>2</sub> O ekstraktų antimikrobinis aktyvumas....	55

## Paveikslų sąrašas

1 pav. Tuopos anatinės dalys.....	14
2 pav. Pagrindiniai tuopų pumpuruose kaupiami lakieji junginiai.....	15
3 pav. Tuopų pumpuruose kaupiami pagrindiniai flavonoidai.....	16
4 pav. Balzakonų bendroji struktūrinė formulė.....	18
5 pav. EPS sistemos aparatūra.....	24
6 pav. Centriškai kompozicinis planas.....	25
7 pav. Balzaminų tuopų išdžiovinti pumpurai.....	27
8 pav. ORAC antioksidacinis aktyumas, išreikštas plotu po kalibracine kreive.....	29
9 pav. Pakopinės <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS eksperimentinių tyrimų schema.....	35
10 pav. Pinocembrino ir pinostrobino struktūrinės formulės.....	36
11 pav. Chlorofilo a ir chlorofilo b struktūrinės formulės.....	36
12 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH kiekvieno priklausomo kintamojo modelio teorinių ir eksperimentinių verčių palyginimas.....	39
13 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH parametrų įtaka priklausomiems kintamiesiems pagal Pareto diagramas.....	42
14 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH 2D bei 3D atsako-paviršiaus plotai, parodantys ekstrakto išeišos, BFJK ir TEAG <sub>ORAC</sub> priklausomybę nuo ekstrakcijos parametrų.....	44
15 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH 2D bei 3D atsako-paviršiaus plotai, parodantys pigmentų kiekio priklausomybę nuo ekstrakcijos parametrų.....	45
16 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH 2D bei 3D atsako-paviršiaus plotai, parodantys pinocembrino ir pinostrobino kiekio priklausomybę nuo ekstrakcijos parametrų.....	46
17 pav. Kietafazės mikroekstrakcijos schema.....	50
18 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH ekstrakto viršerdvėje indentifikuotos lakiųjų junginių klasės.....	50
19 pav. Pagrindiniai <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH ekstrakto viršerdvėje indentifikuoti lakieji junginiai.....	51
20 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H <sub>2</sub> O ekstraktų antimikrobinis aktyvumas.....	55
21 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstrakto tirozinazės inhibicijos geba.....	57
22 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-H <sub>2</sub> O (110 °C, 15 min) ekstrakto tirozinazės inhibicijos geba.....	58
23 pav. Kojo rūgšties tirozinazės inhibicijos gebos priklausomybė nuo laiko.....	58
24 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstrakto tirozinazės inhibicijos gebos priklausomybė nuo laiko.....	59
25 pav. <i>P. balsamifera</i> pumpurų EPS-H <sub>2</sub> O (110 °C, 15 min) ekstrakto tirozinazės inhibicijos gebos priklausomybė nuo laiko.....	59

## Santrumpų sąrašas

- ABTS<sup>•+</sup> – 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas;
- AKF2 (angl. *angiotensin converting enzyme*) – angiotenziną konvertuojantis fermentas;
- BCK – bendras chlorofilų kiekis;
- BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis;
- BKK – bendras karotinoidų kiekis;
- DC-MS – dujų chromatografija-masių spektroskopija;
- E – ekstraktas;
- EPS – ekstrakcija padidintame slėgyje;
- FRAP – trivalentės geležies jonų redukavimo antioksidacinė galia (angl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*);
- LSI – linijinis sulaikymo indeksas;
- KRE – kojo rūgšties ekvivalentas;
- KME – kietfazė mikroekstrakcija;
- MSK (angl. *MIC – minimal inhibitory concentration*) mažiausia slopinančioji koncentracija;
- ORAC (angl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) – deguonies radikalų sujungimo geba;
- PBS – fosfatinis buferinis tirpalas;
- SKE-CO<sub>2</sub> – ekstrakcija superkritiniu anglies dvideginiu;
- TE – Trolokso ekvivalentai;
- TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba;
- TP – tuopų pumpurai (*P. balsamifera*).

## Įvadas

Pastaraisiais metais ypač išaugo natūralių augalinių produktų (ekstraktai, ištraukos ar eteriniai aliejai) naudojimas maisto, farmacijos ar kosmetikos pramonėje. Augalinės žaliavos vertę lemia biologiškai aktyvių junginių, esančių laisva arba surišta forma ir pasižyminčių įvairiomis biologinėmis, fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, kiekis. Dėl šių prižasčių efektyvių ekstrakcijos bei frakcionavimo procesų, skirtų bioaktyviems junginiams išskirti, kūrimas ir taikymas yra vienas svarbiausių uždavinių siekiant racionaliai perdirbti augalinės kilmės žaliavas į aukštesnės pridėtinės vertės komponentus, kurie pasižymi aukštu antioksidaciniu ir priešuždegiminiu aktyvumu, priešvėžinėmis, antivirusinėmis, antibakterinėmis ir kt. savybėmis [1].

Balzaminių tuopų (*P. balsamifera* L.) pumpurai tradicinėje medicinoje yra vertinami dėl plataus terapeutinio poveikio [2]. Tuopų pumpurai bei jų produktai (ekstraktai, ištraukos ir kt.) gali būti naudojami kaip antibakteriniai, priešgrybeliniai, priešuždegiminiai, karščiavimą mažinantys ir greitinantys žaizdų gijimą preparatai [3]. Taip pat ši augalinė žaliava pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu bei tirozinazės aktyvumu ir melanino sintezės slopinimo geba [4]. Dėl vertingų bioaktyvių junginių (pavyzdžiui, pinocembrinas, pinostrobinas, kavos ir ferulio rūgštis bei balzakonai ir kt.) gausos įvairūs tuopų pumpurų ekstraktai gali būti pritaikyti maisto papildų, kosmetikos ir farmacijos pramonėje [4, 5].

Įvairių rūšių tuopų pumpurų bioaktyviųjų junginių išgavimui ir identifikavimui dažnai naudojami tradiciniai, neefektyvūs ekstrakcijos metodai naudojant toksiškus tirpiklius, pavyzdžiui metanolį [6]. Tačiau šiuolaikinės vartotojų tendencijos reikalauja taikyti ekstrahavimo metodus, kurie pasižymėtų saugesniu poveikiu aplinkai ir žmogui. Svarbu naudoti netoksiškus, užtikrinančius efektyvią tikslių junginių ekstrakciją, lengvai pašalinamus, vartotojams priimtinus ir nebrangius tirpiklius [3]. Vienas iš inovatyvių metodų yra ekstrakcija padidintame slėgyje tirpikliais (EPS). Metodas atitinka „žaliosios“ ekstrakcijos reikalavimus, yra efektyvus ir visiškai automatizuotas procesas, leidžiantis tiksliai kontroliuoti temperatūrą ir slėgį, o žaliava apsaugoma nuo šviesos ir deguonies poveikio, taip sumažinant bioaktyvių junginių skilimo riziką. Be to, lyginant su tradiciniais ekstrakcijos metodais, sumažinamas ekstrahavimo laikas, energijos ir tirpiklio sąnaudos [7]. Mokslinių tyrimų apie inovatyvių ekstrakcijos procesų pritaikymą bioaktyviųjų junginių išskyrimui iš *P. balsamifera* pumpurų yra labai mažai [3, 8], todėl panaudojant saugius aplinkai ir žmogui tirpiklius (etanolį ir vandenį), EPS metodas galėtų būti pritaikytas polinių bioaktyviųjų komponentų efektyviam išgavimui iš *P. balsamifera* pumpurų.

Vienas iš svarbiausių uždavinių, siekiant pagaminti bioaktyviais junginiais praturtintus produktus, yra žaliavos ekstrakcijos metodo parametrų optimizavimas. Optimalios ekstrakcijos sąlygos gali skirtis priklausomai nuo eksperimentams panaudotos augalinės žaliavos paruošimo būdo, parinkto tirpiklio, optimizavimui parinktų ekstrakcijos parametrų tipo ir skaičiaus, siekiamo tikslo (pavyzdžiui, gauti didžiausią galimą ekstrakto išeigą, sukcentruoti tikslius tam tikromis funkcinėmis savybėmis pasižyminčius junginius ekstrakto, keisti proceso energijos ar laiko sąnaudas ir kt.) [3]. Norint efektyviai įgyvendinti šiuos uždavinius ekstrakcijų procesams modeliuoti ir optimizuoti dažniausiai naudojamas chemometrinė atsako-paviršiaus metodologija (angl. RSM, *Response Surface Methodology*), grįsta eksperimentiniu dizainu (angl. *DoE, Design of Experiments*) [9]. Ši metodologija yra plačiai naudojama maisto, biotechnologijų bei farmacijos pramonėse, sprendžiant daugiatis bioaktyvių junginių ekstrakcijos optimizavimo uždavinius [3].

Iki šiol literatūros šaltiniuose yra aprašoma tik keletas mokslinių tyrimų, kurių metu buvo atliktas juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų nepolinių bioaktyvių junginių išskyrimas, optimizuojant inovatyvų „žalią“ ekstrakcijos metodą superkritiniu anglies dvideginiu (SKE-CO<sub>2</sub>) ir panaudojant atsako paviršiaus metodologiją [3, 8]. Šiuose tyrimuose nebuvo įvertintos polinių bioaktyviųjų junginių išskyrimo iš liekanos po SKE-CO<sub>2</sub> galimybės, nebuvo ištirtas kitų rūšių tuopų pumpurų, pavyzdžiui, *P. balsamifera* funkcinės savybės, ypač įvertinant tai, kad *P. balsamifera* yra labiau paplitusi šiaurės Europoje nei *P. nigra* rūšis. Taip pat trūksta mokslinių tyrimų, susijusių su įvairių rūšių tuopų pumpurų polinių bioaktyviųjų junginių išskyrimu panaudojant pažangas ekstrakcijos technologijas, pavyzdžiui, taikant ekstrakciją padidintame slėgyje (EPS).

Šių tyrimų tikslas – optimizuoti Lietuvoje augančių balzaminių tuopų (*P. balsamifera*) pumpurų ekstrakcijos aukšto slėgio netoksiškais, aplinkai ir žmogui draugiškais tirpikliais (EtOH ir H<sub>2</sub>O) procesus siekiant šią augalinės kilmės žaliavą perdirbti į aukštesnės pridėtinės vertės funkcionaliuosius komponentus.

Šiam tikslui pasiekti iškelti tyrimo uždaviniai:

1. taikant centriškai kompozicinį eksperimento planą ir atsako-paviršiaus metodologiją, nustatyti ir įvertinti ekstrakcijos etanolio padidintame slėgyje (EPS-EtOH) temperatūros ir laiko įtaką ekstraktų išeigai, *in vitro* antioksidaciniam aktyvumui ir pasirinktiems fitocheminės sudėties rodikliams (tiksliniam fenolinių junginių pinocembrino ir pinostrobinio bei bendram karotinoidų ir chlorofilų kiekiui) bei nustatyti optimalias *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakcijos sąlygas;
2. nustatyti *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto viršerdvės lakiųjų junginių kiekybinę ir kokybinę sudėtį;
3. nustatyti ir įvertinti įvairiomis sąlygomis iš EPS-EtOH liekanos gautų EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų išeigą, *in vitro* antioksidacinį aktyvumą bei tikslinių fenolinių junginių (pinocembrino ir pinostrobinio) kiekį ir nustatyti optimalias *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O ekstrakcijos sąlygas;
4. palyginti optimaliomis sąlygomis gautų *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų išeigas, *in vitro* antioksidacinį aktyvumą ir tikslinių fenolinių junginių (pinocembrino ir pinostrobinio) kiekį;
5. nustatyti ir palyginti optimaliomis sąlygomis gautų *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų antimikrobinį aktyvumą prieš pasirinktas gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas bei mielės;
6. nustatyti optimaliomis sąlygomis gautų *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų tirozinazės inhibicijos gebą bei palyginti su komerciškai naudojamo inhibitoriaus (kojo rūgšties) aktyvumu.

## 1. Literatūros apžvalga

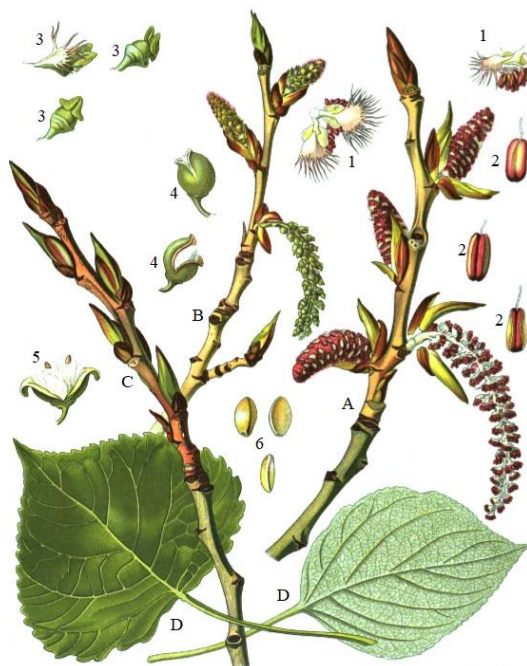
### 1.1. Tuopų bendroji charakteristika, morfologiniai požymiai ir fitocheminė sudėtis

Tuopų (lot. *Populus*) genties augalai priklauso magnolijūnų (lot. *Magnoliophyta*) skyriui, magnolijainių (lot. *Magnoliopsida*) klasei, gluosniažiedžių (lot. *Salicales*) eilei ir gluosninių (lot. *Salicaceae*) šeimai. Šie medžiai auga vidutinio klimato ir subtropiniuose Europos, Vidurio Azijos, Sibiro, Šiaurės bei Pietų Amerikos regionuose [10]. Lietuvoje augančios tuopų rūšys yra baltoji tuopa (*Populus alba* L.), balzaminė tuopa (*Populus balsamifera* L.), juodoji tuopa (*Populus nigra* L.), kanadinė tuopa (*Populus x canadensis* L.), berlyninė tuopa (*Populus x berolinensis* L.), pilkoji tuopa (*Populus x canescens* L.) ir drebulė (*Populus tremula* L.). Nors pietinėje Europos dalyje plačiausiai paplitusi juodųjų tuopų (*Populus nigra*) rūšis, Lietuvoje ji labai reta, o drebulės (*Populus tremula* L.) ir balzaminės tuopos (*Populus balsamifera*) yra dažnos vietinių medžių rūšys [11].

Tuopos dažnai auga natūralioje buveinėje šalia upelių ir kitų vandens telkinių, kai kurios rūšys auginamos kaip dekoratyviniai medžiai parkuose [10]. Sausesnė ir kalnuota aplinka yra daugelio drebulių buveinė, o kai kurios rūšys, tokios kaip Azijos Eufrato tuopos (*Populus euphratica* L.), geba augti sausringose ir druskingose vietose [12]. Tuopos greitai auga ir greitai pasiekia reprodukcinę brandą, be to pasižymi aukšta medienos kokybe. Jos plačiai naudojamos medienos masyvo, plaušienos, popieriaus ir bioenergijos gamyboje. Įvairių tuopų rūšių pumpurų tinktūros naudojamos skausmo, uždegimo bei kosulio malšinimui, o žievės ekstraktai plačiai pritaikomi kosmetikos pramonėje, kaip natūralūs konservantai [13].

Balzaminė tuopa – vidutinio dydžio, greitai augantis, trumpaamžis lapuotis medis, kuris užauga iki 30–60 m aukščio. Jo kamienas tiesus, žievė lygi, nuo pilkos iki pilkšvai rudos spalvos. Lapai pakaitiniai, ovalios formos, 7–12 cm ilgio, 3,5–7,5 cm pločio. Lapo paviršius blizgus, tamsiai žalios spalvos, o apatinė dalis – šviesiai žalios, dažniausiai su rusvomis dėmėmis, pakraščiai smulkiai dantyti [14]. Tuopos turi moteriškus bei vyriškus žiedus, kiekvienas žiedų tipas susitelkęs žirginėliuose (1 pav.). Pumpurai kiaušiniškos formos, smailomis viršūnėmis, žalsvai rudi, subręsta balandžio ar gegužės mėnesiais, prieš pasirodant lapams. Be to, dėl dervų, kurios dengia pumpurus, jie turi blizgančią išvaizdą, yra aromatingi ir lipnūs. Tuopų vaisiai 3–4 mm ilgio, beveik apvalios formos kapsulės su sėklomis viduje, kurios padengtos plaukeliais. Vėjo išsklaidytos sėklos geba pasiskirstyti dideliu atstumu ir pasižymi aukšta regeneracine geba [13, 14].

Vidutinio klimato zonoje (Europa, Šiaurės Amerika, Azija) pagrindinis propolio šaltinis yra dervingas tuopų pumpurų eksudatas. Propolis tai vaško ir biologiškai aktyvių medžiagų, kurias surenka bitės nuo įvairių augalų ir medžių pumpurų ar sakų, produktas [15]. Bitės propolį naudoja mažoms avilio skylutėms ir įtrūkimams užpildyti bei dezinfekuoti, o tai padeda apsisaugoti nuo mikroorganizmų, vabzdžių ir nepalankių oro sąlygų. Iškiriamos dvi pagrindinės tuopų tipo propolio rūšys, kurios skiriasi chemine sudėtimi. Labiausiai paplitusi ir ištirta rūšis, kurioje vyrauja juodosios tuopos (*P. nigra*) pumpuruose kaupiami flavonoidai, tokie kaip chrizinas, galanginas, pinocembrinas, pinobanksinas ir pinocembrino chalkonas. Kitame propolio tipe vyrauja fenolinių junginių gliceridai, būdingi drebulių (*P. tremula*) pumpurams [16]. Propolis pasižymi antimikrobinėmis, antivirusinėmis, antioksidacinėmis, priešuždegiminėmis bei priešnavikinėmis savybėmis, todėl produktas naudojamas kaip natūralus maisto priedas, kaip funkcinis maisto ingredientas ar kosmetikos produktų sudedamoji dalis [17].

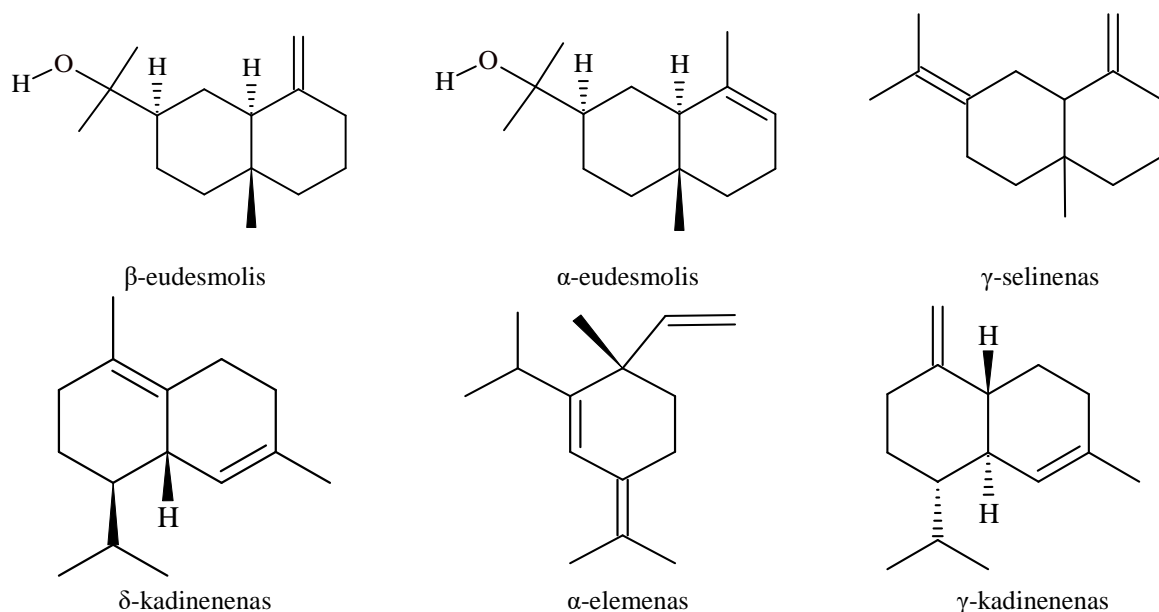


A – šaka su vyriškais žirginėliais; B – šaka su moteriškais žirginėliais; C – šaka su pumpurais; D – lapai; 1 – vyriški žiedai; 2 – kuokeliai; 3 – moteriški žiedai; 4 – vaisiai (dėžutė); 5 – atidaryta dėžutė; 6 – sėklos

**1 pav.** Tuopos anatomicinės dalys [18]

Tuopų anatomicinėse dalyse (žievėje, lapuose, pumpuruose) yra kaupiama daug įvairių junginių, pasižymi skirtingomis savybėmis. Tuopų žievėje randamas didesnis lignino (33 %) ir mažesnis celiuliozės (24,3 %) kiekis, nei paprastai jų randama tuopų medienoje (22,3 % ir 46,7 %, atitinkamai) [13]. Bioaktyvūs gliukozidų junginiai salicinas ir populinas, kurie pasižymi priešuždegiminėmis, karščiavimą mažinančiomis ir analgetinėmis savybėmis, aptinkami beveik visų rūšių tuopų žievėse ir lapuose [19].

Tuopų pumpuruose gausu įvairių klasių vertingų nepolinių ir polinių junginių, tokių kaip terpenai, alkanai, riebalų bei fenolinės rūgštys, chalkonai ir flavonoidai. Vaško kiekis balzaminių tuopų (*P. balsamifera*) pumpuruose sudaro apie 2,0 %, kuris panašus į vaško kiekį spygliuočiuose [20, 21]. Jerkovič'ius ir Mastelič'ius ištyrė juodųjų tuopų pumpurų (*P. nigra*) eterinio aliejaus lakiųjų komponentų kokybinę ir kiekybinę sudėtį. Oksiduoti seskviterpenai  $\beta$ -eudesmolis ir  $\alpha$ -eudesmolis sudaro 26,3–28,7 % eterinio aliejaus. Kiti pagrindiniai seskviterpenų klasės junginiai yra  $\gamma$ -selinenas (7,6–8,8 %),  $\delta$ -kadinenenas (7,8–8,6 %),  $\alpha$ -elemenas (3,3–5,2 %) ir  $\gamma$ -kadinenenas (3,9–4,2 %) (2 pav.) [19]. Šie junginiai suteikia tuopų pumpurams būdingą aromata ir pasižymi plačiu farmakologiniu poveikiu, pavyzdžiui, antimaliariniu, citotoksiniu, priešgrybeliniu, antibakteriniu, antivirusiniu, priešuždegiminiu ir kt. [22].



**2 pav.** Pagrindiniai tuopų pumpuruose kaupiami lakieji junginiai

Juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpuruose gausu polinių junginių, pavyzdžiui fenolinių rūgščių: kavos, *p*-kumaro, ferulio, izoferulino ir cinamono. Jos sudaro 5,2 % visų bioaktyvių junginių pumpuruose, po jų seka salicilatai (1,8 %) ir flavonoidai (pinobanksinas ir pinocembrinas, 1,5 %) [23]. Fenolinės rūgštys ir kiti bioaktyvieji poliniai komponentai taip pat dominuoja balzaminių tuopų (*P. balsamifera*) pumpuruose, o kai kurių junginių kiekis yra didesnis. Pavyzdžiui Isidorov'as ir Vinogorova nustatė, jog benzoinė rūgštis buvo vienas iš pagrindinių komponentų balzaminių tuopų (*P. balsamifera*) pumpurų ištraukose (12,8 %), o juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų ištraukose šis komponentas sudarė tik 0,8 %. *P. balsamifera* pumpurų ekstraktuose nustatytas beveik penkis kartus didesnis *p*-kumaro rūgšties kiekis nei *P. nigra* pumpuruose, tuo tarpu kavos rūgšties kiekis buvo septynis kartus mažesnis [21]. Fenolinės rūgštys ir flavonoidai gerai žinomi dėl antioksidacinių, priešuždegiminių, antimikrobinių bei tirozinazės slopinimo savybių, taip pat pasižymi fotoapsauginiu poveikiu. Tuopų pumpurai, kuriuose gausu šių daugiafunkcinių junginių, gali būti pritaikyti kuriant naujus vaistus bei inovatyvius fitodermatoginius preparatus ar tapti funkcinio maisto ingredientu [24].

## 1.2. Tuopų pumpurų poliniai bioaktyvieji junginiai

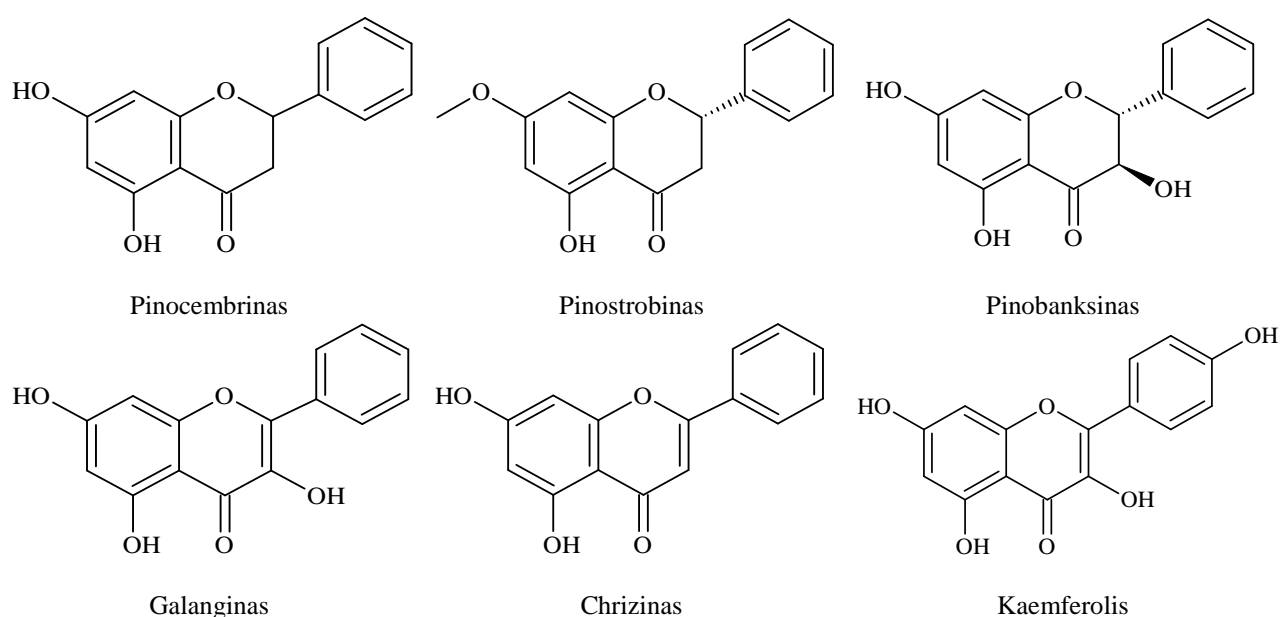
Įvairių rūšių tuopų pumpurai yra vertingas polinių bioaktyviųjų junginių šaltinis [25]. Fenoliniai junginiai – tai pagrindiniai augaluose kaupiami antriniai metabolitai, kurie svarbūs augalų augimui ir vystymuisi, įskaitant sėklų daigumą, biomasės kaupimąsi ir augalų metabolizmą [26]. Šie junginiai lemia augalų pigmentaciją, skonį, dalyvauja ląsteliniuose ir tarpląsteliniuose fiziologiniuose procesuose, taip pat yra atsakingi už apsaugines augalo savybes, pavyzdžiui atsparumą patogenams [27]. Poliniai bioaktyvieji junginiai pasižymi dideliu antioksidaciniu, priešuždegiminiu, priešvėžiniu ir antibakteriniu aktyvumu. Jie plačiai naudojami gydant daugelį su oksidaciniu stresu susijusių ligų, tokių kaip širdies ir kraujagyslių ligos, vėžys, senėjimas, cukrinis diabetas ir neurodegeneracinės ligos [28].

Pagrindinės penkios bioaktyviųjų fenolinių junginių klasės yra fenolinės rūgštys, flavonoidai, stilbenai, lignanai ir taninai [29]. Augaluose jie biosintetinami iš tarpinės medžiagos fenilalanino ir šikiminės rūgšties, naudojant šikiminės rūgšties sintezės kelią [30]. Jų sintezė aktyvuojama abiotinio streso sąlygomis (sausra, sunkieji metalai, druskingumas, aukšta/žema temperatūra ir ultravioletinė

spinduliuotė) [26]. Fenoliniai junginiai sudaryti iš vieno ar kelių benzeno žiedų, prie kurių prijungtos hidroksilo grupės. Tiek hidroksilo grupių skaičius, tiek jų konfigūracija yra pagrindinės struktūrinės savybės, lemiančios fenolinių junginių antioksidacinį aktyvumą [31].

### 1.2.1. Flavonoidai

Didžiausią augalinių fenolinių junginių grupę sudaro flavonoidai. Tai mažos molekulinės masės (200–600 g/mol) polifenolinių junginių klasė, kurių pagrindą sudaro benzo- $\gamma$  pirono žiedas, penkiolikos anglies atomų konfigūracija. Flavonoidai dar skirstomi į šešis pogrupius, tokius kaip flavonai, flavonoliai, flavanoliai, flavononai, izoflavonoidai ir antocianinai [29]. Tuopų pumpuruose randama 20–30 % flavonoidų, iš kurių pagrindiniai yra pinocembrinas, pinostrobinas, pinobanksinas, galanginas, chrizinas ir kaemferolis (3 pav.). Mokslinių tyrimų duomenimis nustatyta, kad šie bioaktyvūs junginiai pasižymi antibakteriniu, antivirusiniu, priešgrybeliniu, antioksidaciniu ir priešūždegiminiu poveikiu [3, 32].



**3 pav.** Tuopų pumpuruose kaupiami pagrindiniai flavonoidai

Tuopų pumpuruose randama iki 750 mg/100 g pinostrobinas ir iki 500 mg/100 g pinocembrinas [3]. Pinocembrinas pasižymi priešūždegiminėmis ir neuroprotekcinėmis savybėmis, taip pat gebėjimu efektyviai sumažinti reaktyvias deguonies formas (ROS) bei reguliuoti ląstelių apoptozės procesą [33]. Iki klinikiniai moksliniai tyrimai rodo, kad pinocembrinas gali sumažinti išeminio insulto sukeltus kognityvinius sutrikimus ir sumažinti mitochondrijų disfunkciją bei oksidacinio streso laipsnį [33, 34]. Išeminis insultas tai ūminis kliniškas sindromas, kuris pasireiškia neurologiniais sutrikimais, tokiais kaip paralyžius, kalbos ir atminties sutrikimai, dėl kraujotakos sutrikimo pacientą gali ištikti mirtis. Išeminis insultas yra trečioji pagal dažnį, po širdies kraujagyslių ligų ir vėžio, mirties priežastis Europoje, todėl naujų vaistų paieška šiai ligai gydyti yra ypač aktuali [35]. Dėl reikšmingo farmakologinio aktyvumo, Kinijos maisto ir vaistų administracija (angl. *China Food and Drug Administration, CFDA*) patvirtino pinocembriną kaip naują vaistinę medžiagą išeminiam insultui gydyti. Šiuo metu yra atliekami II fazės klinikiniai tyrimai [36]. Pinocembrinas pasižymi ne tik geromis farmakologinėmis savybėmis, bet ir farmakokinetikos parametrais. Nustatyta, jog pavartojus per burną, pinocembrinas greitai absorbuojamas ir lengvai pereina hemoencefalinį barjerą

[33, 34]. Naujausi moksliniai tyrimai parodė pinocembrino priešnavikinį aktyvumą gydant melanomą, antifibrozinį, priešgrybelinį ir antimikrobinį poveikį [37].

Pinostrobinas yra natūralus flavanonas, pasižymintis antivirusiniu ir priešvėžiniu aktyvumu. Wu ir kt. atlikto tyrimo metu nustatyta, jog 22,72 µg/ml koncentracijos pinostrobinas 50 % sumažina *Herpes* viruso (HSV-1) replikaciją, kuris sukelia lūpų ir burnos infekcijas. Remiantis epidemiologiniais tyrimais, daugumoje šalių HSV-1 infekcijos lygis nuolat didėja, o vaistams atsparių virusų atsiradimas tampa vis didesne problema, todėl ieškoma veiksmingesnių ir netoksiškų veikliųjų medžiagų šiai ligai gydyti [38]. Taip pat pinostrobinui būdingos priešvėžinės savybės slopinant nuo estrogeno priklausomas (MCF-7) žmogaus krūties vėžio ląsteles bei antiproliferacinis aktyvumas T-limfoblastinės leukemijos ląstelių linijoje, kurį iš dalies galima paaiškinti I topoizomerazės slopinimu. Pinostrobinas gali būti biotransformuojamas į ląsteles, o jų metabolitai taip pat gali turėti tam tikrą priešvėžinį aktyvumą [39].

Kiti tuopų pumpurams būdingi flavonoidai taip pat pasižymi plačiu terapeutiniu poveikiu. Pinobanksinui būdingas antioksidacinis, antibakterinis, priešgrybelinis bei antiproliferacinis poveikis. Jau dešimtmečius kuriami įvairūs angiogeniniai inhibitoriai, siekiant sumažinti naujų kraujagyslių formavimąsi ir navikų progresavimą. Naujausių mokslinių tyrimų duomenimis, Bang'as ir Ahn'as nustatė, kad pinobanksinui yra būdingas antiangiogeninis poveikis kraujagyslių endotelio ląstelėms [40]. Flavonas galanginas slopina neurouždegimą, todėl gali būti naudojamas kaip neuroprotekcinis agentas gydant ar siekiant išvengti smegenų išemijos komplikacijų bei neurodegeneracinių ligų (Alzheimerio ir Parkinsono ligos) [32]. Įvairūs flavonoidai plačiai naudojami maisto, kosmetikos pramonėje bei maisto papildų gamyboje [41].

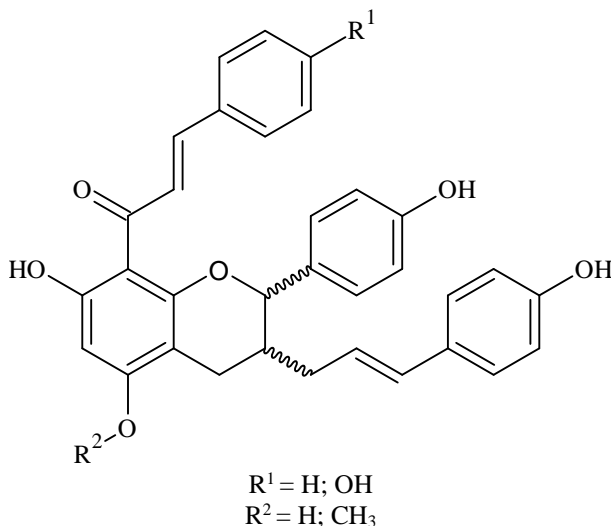
### 1.2.2. Fenolinės rūgštys

Tuopų pumpuruose gausu fenolinių rūgščių, daugiausia benzoinės, kavos, ferulio bei *p*-kumaro [21]. Pastarąjį dešimtmetį šių junginių aktyvumas yra plačiai tiriamas [41, 42]. Ferulio rūgštis pasižymi antioksidaciniu, priešuždegiminiu, hepatoprotekciniu, antikarcinogeniniu, antimutageniniu ir neuroprotekciniu poveikiu. Kavos rūgštis pasižymi stipriu antioksidaciniu ir priešuždegiminiu aktyvumu, kuris susijęs su vėžio, neurodegeneracinių ligų ir diabeto prevencija [44]. Ferulio ir kavos rūgštys plačiai naudojamos kosmetikos pramonėje kaip fotoprotekcinė sudedamoji dalis daugelyje odos losjonų ir kremų, skirtų apsaugai nuo saulės spindulių [45]. Kavos ir ferulio rūgštys *in vitro* efektyviai apsaugo fosfatidilcholino liposomas nuo UV spindulių sukeltos peroksidacijos. Atsižvelgiant į tai, kad UV spinduliuotė giliai prasiskverbia į odą, vietiskai vartojami preparatai gali suteikti odai pakankamą apsaugą tik tada, jei jie prasiskverbia per raginį odos sluoksnį. Atlikus mokslinius tyrimus naudojant Franzo ląsteles, įrodyta, kad ferulio ir kavos rūgštys prasiskverbia per žmogaus odos raginį sluoksnį [46].

Benzoinė rūgštis plačiai naudojama maisto pramonėje kaip antibakterinis ir priešgrybelinis konservantas. Mao ir kt. atlikti tyrimai parodė, kad benzoinė rūgštis gali pagerinti žarnyno funkcijas (virškinimą ir absorbciją) reguliuojant fermentų aktyvumą [47]. *p*-Kumaro rūgštis plačiai naudojama chemijos, maisto, kosmetikos ir farmacijos pramonėje. Ši rūgštis sumažina mažo tankio lipoproteinų peroksidaciją, pasižymi antimutageniniu ir antibakteriniu poveikiu, slopina melanino gamybą. Be to, *p*-kumaro rūgštis dalyvauja resveratrolio, kuris yra vienas iš stipriausių gamtoje aptinkamų antioksidantų, sintezės procese [48].

### 1.2.3. Balzakonai

Balzaminių tuopų (*P. balsamifera*) pumpuruose randama iki 80 mg/g dihidrochalkonų klasės junginių, kurie vadinami balzakonais (4 pav.) [49]. Šie junginiai pasižymi antimikrobinėmis savybėmis, ypač prieš gramteigiamą patogeną *Staphylococcus aureus* ir meticilinui atsparius analogus (MRSA). *Staphylococcus aureus* sukelia įvairias infekcijas, pavyzdžiui paviršinės odos pažeidimus, minkštųjų audinių infekcijas ar invazines ligas (pneumonija, endokarditas ir osteomielitas). Šių infekcijų gydymą apsunkina nuolat didėjantis bakterijų atsparumas antibiotikams, kuris tampa pagrindine sveikatos problema visame pasaulyje, todėl balzakonai gali būti perspektyvia nauja antibiotikų klase [50].



4 pav. Balzakonų bendroji struktūrinė formulė

Dėl priešūždegiminio ir antioksidacinio poveikio, balzakonai taip pat gali būti veiksmingi gydant psoriazę. Atlikti tyrimai parodė didelį šių junginių potencialą normalizuoti psoriazės keratinocitų proliferaciją ir pagerinti jų diferenciaciją [51]. Psoriazė yra odos sutrikimas, kuriam būdinga epidermio hiperplazija, hiperkeratozė ir uždegimas. Padidėjęs epidermio sluoksnyje esančių keratinocitų dauginimasis sukelia odos paviršiaus pleiskanojimą ir skausmingų sidabro spalvos žvynelių susidarymą. Šiuo metu rinkoje esantys gydymo būdai tik pagerina pacientų gyvenimo kokybę ir yra susiję su nepageidaujamu šalutiniu poveikiu. Taigi tyrimai, skirti veiksmingų ir saugesnių terapinių agentų kūrimui psoriazei gydyti, vis dar aktualūs [51, 52].

### 1.3. Tuopų pumpurų savybės

Įvairių rūšių tuopų pumpurams būdingas aukštas antioksidacinis, priešūždegiminis, antibakterinis antivirusinis ir priešvėžinis aktyvumas (1 lentelė), kuris siejamas su dideliu, pumpuruose kaupiamu, flavonoidų kiekiu (pinostrobinu ir pinocembrinu), fenolinėmis rūgštimis (*p*-kumaro, kavos ir ferulio rūgštys) bei balzakonais [5, 8, 23, 53].

**1 lentelė.** Tuopų pumpurams būdingos savybės

Tuopų rūšis	Veikimo mechanizmas	Poveikis	Lit. šaltinis
Juodoji tuopa ( <i>P. nigra</i> ) ir balzaminė tuopa ( <i>P. balsamifera</i> )	Sumažina malondialdehido ir padidina superoksido dismutazės kiekį serume ir kepenų homogenate*	Antioksidacinis	[23, 51, 54, 55, 56]
Juodoji ( <i>P. nigra</i> ) tuopa ir berlyninė ( <i>P. × berolinensis</i> ) tuopa	Sumažina interleukino 6 (IL-6), naviko nekrozės faktoriaus $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) ir ciklooksigenazės-2 (COX- 2) kiekį kepenų homogenate*	Priešuždegiminis	[25, 56]
Juodoji tuopa ( <i>P. nigra</i> ), balzaminė tuopa ( <i>P. balsamifera</i> ), baltoji tuopa ( <i>P. alba</i> ) ir drebulė ( <i>P.tremula</i> )	Inhibuoja meticilinui atsparias <i>Staphylococcus aureus</i> ir <i>Klebsiella pneumonia</i> bakterijas	Antibakterinis	[15, 49, 57]
Juodoji tuopa ( <i>P. nigra</i> )	Pinocembrinas sukelia citotoksiškumą žmogaus storosios žarnos vėžio HCT116 ląstelių linijoms	Priešvėžinis	[58]
Juodoji tuopa ( <i>P. nigra</i> )	Neutralizuojamas $AlCl_3$ sukeltas neurotoksiškumas*	Neuroprotekcinis	[59]
Juodoji tuopa ( <i>P. nigra</i> )	Sumažina kraujagyslių sienelių įtampą	Vasorelaksantinis	[55]
Juodoji tuopa ( <i>P. nigra</i> )	Apsaugo kepenis nuo $AlCl_3$ sukulto kepenų pažeidimo ir nekrozės*	Hepatoprotekcinis	[55]
Juodoji tuopa ( <i>P. nigra</i> )	Sumažina šlapimo rūgšties koncentraciją kraujyje*	Antihiperurikeminis	[59]
Juodoji tuopa ( <i>P. nigra</i> )	Padidina jautrumą ir sumažina atsparumą insulinui, sumažina gliukozės ir gliukoato hemoglobino kiekį kraujyje*	Antidiabetinis	[56]

\* – tyrimai atlikti su eksperimentiniais gyvūnais

Antioksidacinį aktyvumą galima apibrėžti kaip bioaktyviųjų medžiagų gebėjimą slopinti laisvųjų radikalų veikimą ar užkirsti kelią jų susidarymui, taip sumažinant oksidacinę žalą žmogaus organizme. Antioksidantai su laisvaisiais radikalais reaguoja skirtingais mechanizmais – vandenilio atomo perkėlimo arba elektrono perdavimo mechanizmu. Vandenilio atomo perkėlimo mechanizme antioksidanto vandenilio atomas perduodamas laisvajam radikalui, kuris inaktyvuojamas, o pats antioksidantas tampa radikalui. Elektrono perdavimo mechanizmas veikia antioksidantui priimant elektroną iš radikalo, taip abu junginiai tampa radikalinais katijonais. Daugeliu atvejų šios dvi reakcijos vyksta vienu metu, o reakcijos mechanizmą lemia antioksidanto struktūra, tirpumas, pasiskirstymo koeficientas ir tirpiklio poliškumas [60].

Laisvieji radikalai apibūdinami kaip bet kuri molekulių rūšis, kurioje yra nesuporuotų elektronų. Tai nestabilūs ir labai reaktyvūs radikalai, galintys atiduoti arba priimti elektroną iš kitų molekulių, todėl elgiasi kaip oksidatoriai arba reduktoriai [61]. Šie junginiai veikia kaip signalinės ir efektorinės molekulės gyvybiškai svarbiuose biologiniuose procesuose, tokiuose kaip ląstelių augimas, diferenciacija, proliferacija ir atsakas į įvairius išorinius dirgiklius. Dėl išorinių veiksnių (saulės spinduliuotė, rūkymas, aplinkos teršalai) poveikio, padidėjęs laisvųjų radikalų kiekis pažeidžia ląstelių branduolyje ir membranose esančias biologiškai svarbias molekules (lipidai, angliavandeniai, baltymai ir DNR) bei gali tapti daugelio žmonių ligų, pavyzdžiui, Alzheimerio ligos, vėžio ar su uždegimu susijusių patologijų, priežastimi [61, 62]. Debbache-Benaida ir kt. atlikto tyrimo metu, nustatė tuopų pumpurų ekstrakto neuroprotekcinį poveikį. Vartojant 200 mg/kg koncentracijos ekstraktą 4 savaites, preparatas normalizavo piramidines ląsteles pelių smegenų žievėje, sukeldamas

neuroprotektinį poveikį [59]. Tyrimų, kuriuose būtų aprašytas tuopų pumpurų priešnavikinis poveikis nėra daug. Tačiau šis aktyvumas siejamas su pinocembrinu, kuris yra vienas iš gausiausių tuopų pumpurų polinių komponentų [8]. Įrodyta, kad pinocembrinas sukelia citotoksiškumą žmogaus storosios žarnos vėžio HCT116 ląstelių linijoms bei padidina kaspazės 3 ir kaspazės 9 aktyvumą [58].

Dėl aukšto antioksidacinio aktyvumo įvairių rūšių tuopų pumpurai gali būti pritaikyti farmacijos ar bei maisto pramonėje, pavyzdžiui kaip funkcinio maisto ingredientai ar konservantai. Dudonne ir kt. atlikti moksliniai tyrimai rodo, kad juodųjų tuopų pumpurų antioksidacinės savybės susijusios su odos senėjimą slopinančiu poveikiu, todėl žaliava galėtų būti pritaikyta kosmetikos pramonėje kuriant inovatyvius fitodermatologinius preparatus [23].

Padidėjęs melanino kiekis epidermyje gali sukelti daugybę odos sutrikimų, tokių kaip šlakų (lentigo dėmių) atsiradimą, hiperpigmentaciją ar net uždegiminę pigmentaciją [63]. Įrodyta, jog daugybė skirtingų cheminių junginių slopina melanogenezę slopindami tirozinazės aktyvumą, pavyzdžiui, hidrochinonas, askorbo rūgšties dariniai, kortikosteroidai, kojo bei azelaino rūgštys, tačiau dauguma šių junginių yra draudžiami kosmetikoje ir odos priežiūros produktuose. Be to, ilgalaikis šių cheminių medžiagų naudojimas gali pakenkti odai [64]. Nemaža dalis augalinių ekstraktų yra stiprūs melanino susidarymo inhibitoriai, kurių veikimas yra panašus į anksčiau minėtų cheminių junginių, o jų pranašumas yra tai, jog jie nesusiję su melanocitų citotoksiškumu [65]. Pavyzdžiui, Maack'as ir Pegard'as nustatė, jog juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų absoliutas (39 ppm koncentracija) sumažina viduląstelinio melanino kiekį net 50 %, o vartojant 1000 ppm koncentracijos juodųjų tuopų pumpurų absoliutą, pašviesėja odos epidermis ir 20 % sumažėja melanino kiekis [4]. Šiaurinėje Europos dalyje juodosios tuopos (*P. nigra*) yra gana retos ir nykstančios, todėl būtų tikslinga ištirti kitų tuopų rūšių, pavyzdžiui balzaminės tuopos (*P. balsamifera*) pumpurų tirozinazės slopinimo gebą ir panaudojimo potencialą odą šviesinančios kosmetikos gamyboje [11].

Juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų eterinis aliejus pasižymi antibakterinėmis bei odą regeneruojančiomis savybėmis, taip pat gali būti pritaikytas gydant daugelį dermatologinių odos problemų. Antimikrobinis aktyvumas nustatytas dviems bakterijų padermėms (metecilinui atsparūs *Staphylococcus aureus* ir *Klebsiella pneumonia*). Juodųjų tuopų pumpurų eterinis aliejus efektyviau slopina šias bakterijų padermes nei sintetiniai antibiotikai [57]. Lavoie ir kt. ištyrė balzaminės tuopų (*P. balsamifera*) pumpuruose kaupiamų balzakonų antibakterines savybes. Nustatyta, jog balzakonai pasižymi stipriu antibakteriniu poveikiu prieš *Staphylococcus aureus* bakterijų padermę (mažiausia slopinanti koncentracija 3,1–6,3  $\mu\text{M}$ ) [5]. Dėl fenolinių junginių gausos ir plataus terapeutinio poveikio tuopų pumpurų ekstraktai galėtų būti panaudojami kuriant inovatyvius fitodermatologinius preparatus.

#### **1.4. Polinių junginių ekstrakcijos būdai ir proceso optimizavimas**

Bioaktyvieji junginiai naudojami įvairiuose komerciniuose sektoriuose, tokiuose kaip farmacijos, kosmetikos, maisto ir chemijos pramonė, todėl jų ekstrahavimas iš augalinių žaliavų yra svarbi mokslinių tyrimų dalis. Augaliniai ekstraktai išgaunami iš šviežių, džiovintų ar šaldytų žaliavų. Paprastai prieš ekstrahavimą žaliavos yra smulkinamos iki tam tikro dydžio dalelių naudojant įvairius malimo įrenginius [66]. Svarbu, jog dydis būtų kuo vienodesnis ir optimalus, taip pasiekiamas vienodas ekstrahavimo efektyvumas. Esant per stambioms dalelėms, ekstrakcijos procesas tęsiasi ilgai ir yra nuostolingas, o per daug susmulkinus žaliavą, iš suardytų ląstelių išskiriamos medžiagos, lėtinančios ekstrakcijos procesą (pavyzdžiui, baltymai, pektinai ir kiti didelės molekulinės masės

junginiai), be to, smulkinimui sunaudojama per daug energijos, žaliava gali pradėti kaisti ir skilti termiškai labilūs junginiai [67]. Žaliavos ekstrahavimo efektyvumas taip pat priklauso nuo tirpiklių tipo, jų poliškumo, ekstrahavimo laiko bei temperatūros, žaliavos ir tirpiklio santykinio kiekio, taip pat nuo žaliavos cheminės sudėties ir fizinių savybių. Be to, augaluose fenoliniai junginiai gali būti susijungę su angliavandeniais ar baltymais, todėl nėra universalus ekstrahavimo metodo, tinkamo visiems poliniams junginiams augalinėje žaliavoje išgauti [68]. Tinkamas tirpiklių pasirinkimas yra esminis faktorius ekstrahuojant bioaktyvius junginius iš augalinės žaliavos. Polifenoliniams junginiams ekstrahuoti naudojami poliniai tirpikliai, tokie kaip vanduo, alkoholiai (daugiausia etanolis ir metanolis), acetonas, etilo acetatas ar vandens ir jų mišiniai. Nepoliniai komponentai gali būti išskiriami naudojant heksaną, tolueną, dietileterį ar superkrizinį anglies dvideginį. Augaliniai ekstraktai plačiai naudojami įvairiems fitofarmaciniams preparatams bei maisto papildams gaminti. Kadangi kai kurie tirpikliai, tokie kaip heksanas, metanolis, chloroformas ar toluenas, yra toksiški, preparatuose jų likučių kiekis griežtai kontroliuojamas. Idealus „žalioji“ tirpiklis turi pasižymėti aukšta tikslinių komponentų tirpinimo geba, būti netoksiškas žmogui ir aplinkai, turėti aukštą pliūpsnio temperatūrą bei būti lengvai perdirbamas [69].

Kaip aptarta 1.1 ir 1.2 skyriuose, įvairių rūšių tuopos yra vieni plačiausiai paplitusių medžių Šiaurės pusrutulyje. Tuopų pumpurai ir jų pagrindu pagaminti produktai įvairių šalių netradicinėje medicinoje yra naudojami dėl jų stipraus antimikrobinio ir priešuždegiminio poveikio, vartojami karščiavimui mažinti, gydant kvėpavimo sistemos, virškinamojo trakto ir dermatologines ligas. Šiuose pumpuruose esantys nepoliniai ir poliniai junginiai (pvz., eterinių aliejų sudėtyje esantys monoterpėnai ir seskviterpėnai, fenoliniai junginiai pinocebrinas, pinostrobinas, kavos rūgštis, ferulio rūgštis, balzakonai ir kt.) pasižymi stipriu antioksidaciniu, priešuždegiminiu, neuroprotekciniu, antimikrobinu, priešnavikiniu, priešgrybeliniu poveikiais [3, 4]. Nepaisant to, mokslinėje literatūroje daugiausiai yra publikuojami tik tam tikro poliškumo ekstraktų, pagamintų tradiciniais metodais ir panaudojant toksiškus tirpiklius, rezultatai, o mokslinių duomenų apie inovatyvių ekstrakcijos procesų pritaikymą ir optimizavimą veikliųjų medžiagų išskyrimui iš tuopų pumpurų yra labai mažai (2 lentelė) [6].

Kai kurie ekstrakcijos metodai jau naudojami kelis dešimtmečius ir gali būti vadinami tradiciniais [70]. Dažnai įvairių rūšių tuopų anatominės dalys, tokios kaip pumpurai ar žievė, ekstrahuojamos tradiciniu maceracijos būdu [6, 71]. Žaliava patalpinama į uždara indą su tirpikliu ir leidžiama pastovėti kambario temperatūroje, dažnai maišant, kol išstirps bioaktyvieji junginiai. Išgavimo procesas paprastai yra gana ilgas ir tęsiasi kelias dienas ar net savaites. Norint padidinti ekstrahavimo išeią, galima augalinę žaliavą pakartotinai maceruoti. Dvigubas ar trigubas maceravimas naudingas ypač tada, kai tiksliniai komponentai yra labai vertingi [72]. Šis metodas yra pigus, nereikalaujantis sudėtingos įrangos ar įgūdžių. Tačiau ekstrahavimo procesas ilgas ir mažai efektyvus, naudojami dideli tirpiklių kiekiai, po ekstrakcijos reikalingos filtravimo ir tirpiklio pašalinimo procedūros [70]. Bioaktyviųjų junginių išgavimas iš tuopų pumpurų ar medienos atliekamas ir kitais tradiciniais metodais, pavyzdžiui, Soksleto ekstrakcijos, perkoliacijos ar hidrodistiliacijos [3, 66, 73]. Šie metodai yra paprasti ir pigūs, tačiau ekstrahavimo procesas ilgas, be to, galimas tikslinių junginių terminis skilimas, nes Soksleto ekstrakcija ir hidrodistiliacija paprastai vyksta ilgą laiką tirpiklio virimo temperatūroje [74].

Šiuo metu moksliniai tyrimai nukreipti į inovatyvius ekstrakcijos metodus, kuriais siekiama rasti optimalias proceso sąlygas, sumažinti energijos suvartojimą, padidinti tikslinių ekstrakcijos produktų

**2 lentelė.** Ekstrakcijos metodai taikomi ekstrahuojant tuopų anatomines dalis

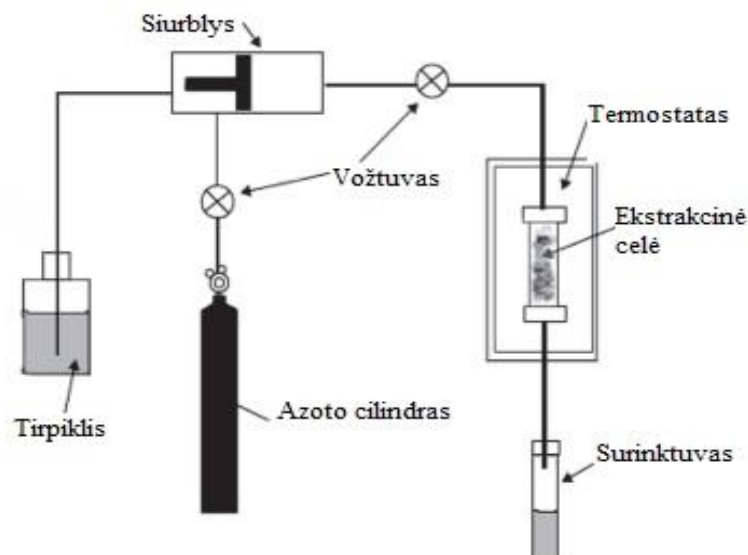
Ekstrakcijos metodas	Tuopų rūšis ir anatinė dalis	Ekstrakcijos sąlygos	Tirpiklis	Rezultatai	Lit. šalt.
Maceracija	Smulkiadantės tuopos ( <i>P. tremuloides</i> ) žievė	Kamb. temp., 24 val.	95 % EtOH	Ekstrakto išeiga 12 %	[71]
Maceracija	J. tuopų ( <i>P. nigra</i> ) pumpurai	24 val.	MeOH	Tikslinių jung. išeiga, mg/g likučių: rozmarino rūgštis (14,46), kaempferolis (5,17), kvercetas (2,07), elaginė rūgštis (1,98), <i>p</i> -kumaro rūgštis (1,73)	[6]
Soksleto ekstrakcija	Drebulės ( <i>P. tremula</i> ) šakota mediena	24–48 val.	MeOH	Tikslinio junginio išeiga, mg/g: naringenas (8,8–11,5)	[73]
Perkoliacija	J. tuopų ( <i>P. nigra</i> ) pumpurai	0,1 ml/min, 16–33 val.	70 % ir 96 % EtOH	Ekstrakto išeiga: 49,10–74,22 g/100 g;	[66]
Maceracija naudojant ultragarsą	Balzaminių tuopų ( <i>P. balsamifera</i> ) pumpurai	35 °C, 60 min	70 % EtOH	Tikslinių jung. išeiga, mg/g pumpurų: <i>p</i> -kumaro rūgštis (13,55), cinamono rūgštis (10,67), galanginas (8,76), pinobanksinas (1,92)	[75]
Maceracija naudojant ultragarsą	Drebulės ( <i>P. tremula</i> ) lapai	80 °C, 45 min	50 % MeOH	Tikslinių jung. išeiga, mg/100 g pumpurų: <i>p</i> -kumaro rūgštis (2,57), ferulo rūgštis (4,25), izokvercetrinas (93,78), kvercetrinas (14,94)	[76]
Ekstrakcija ultragarsu	J. tuopų ( <i>P. nigra</i> ) pumpurai	40 °C, 45 min, 756 W	70 % EtOH	Tikslinių jung. išeiga, %: chrizinas (1,69–14,11), pinocembrino chalkonas (1,76–21,72), galanginas (2,82–15,25), pinostrobino chalkonas (0,94–10,77)	[17]
Hidrodistiliacija	J. tuopų ( <i>P. nigra</i> ) pumpurai	3 val.	Pentanas / dietileteris (1:2)	Tikslinių junginių išeiga, mg/100 g pumpurų: pinostrobinas (751,7), pinocembrinas (485,6), 3-O-pinobanksino acetatas (290,2) ir metil-butenil- <i>p</i> -kumaratas (144,9)	[3]
SKE-CO <sub>2</sub>	J. tuopų ( <i>P. nigra</i> ) pumpurai	8,3–33,7 MPa, 35,8–64,4 °C	CO <sub>2</sub>	Optimalios sąlygos 30 MPa/60 °C; Tikslinių jung. išeiga, mg benzilsalicilato ekv./100 g pumpurų: pinostrobino chalkonas (1574,2), β-eudesmolis (640,8), α-eudesmolis (581,9), 2-metil-2-butenil- <i>p</i> -kumaratas (289,9), pentil- <i>p</i> -kumaratas (457,0), γ-eudesmolis (294,4) ir benzilsalicilatas (289,2)	[3]
SKE-CO <sub>2</sub>	J. tuopų ( <i>P. nigra</i> ) pumpurai	8,3–33,7 MPa, 40–64,1 °C	CO <sub>2</sub>	Ekstrakto išeiga: 0,38–10,28 g/100 g; Tikslinių junginių išeiga, μg/mg: <i>p</i> -kumaro rūgštis (0,33–1,52), pinocembrinas (20,99–47,24), galanginas (4,04–10,25), pinostrobinas (51,73–79,56), pinobanksinas (0,41–1,55) ir chrizinas (0,97–2,03)	[8]
SKE-CO <sub>2</sub>	J. tuopų ( <i>P. nigra</i> ) sėklos	15–25 MPa, 40–80 °C	CO <sub>2</sub>	Ekstrakto išeiga: 2,2–7,7 g/100 g; Polinesočiujų riebalų rūgščių kiekis: linolo rūgštis 28,3 %, γ-linolenol rūgštis 18,0 % ir dihomo-γ-linolenol rūgštis 10,9 %	[77]

kiekį ir pakeisti įprastus tirpiklius ir ekstrakcijos metodus mažiau aplinkai kenksmingomis alternatyvomis (2 lentelė) [3]. Tuopų pumpurų bioaktyvių junginių išskyrimo, taikant inovatyvius ekstrakcijos metodus, pavyzdžių mokslinėje literatūroje yra nedaug. Pavyzdžiui, Stančiauskaitė ir kt. tikslinių junginių išgavimui iš *P. balsamifera* pumpurų pasirinko inovatyvų ekstrakcijos ultragarsu metodą [75]. Ekstrakcijos ultragarsu varomoji jėga yra kavitacija. Proceso metu terpės viduje susidaro kavitacijos burbuliukai. Pasiekus kritinę ribą, jie sprogs ir daugybę mikroskopinių burbuliukų ir išsiskiriamas didelis energijos kiekis, sukuriama lokalizuota aukšto slėgio (1000 atm) ir aukštos temperatūros (apie 4700 °C) zonos [78]. Veikiama didelės energijos, matricos paviršius plyšta ir galiausiai aktyvieji komponentai išsiskiria į tirpiklį [79]. Ekstrahavimas ultragarsu tai paprastas, nebrangus bei efektyvus bioaktyviųjų junginių ekstrahavimo metodas lyginant su tradiciniais. Ekstrahuoti galima žemesnėse temperatūrose ir taip išgauti termolabilius junginius. Tačiau proceso metu skatinamos oksidacijos reakcijos, generuojami radikalai, galintys trukdyti bioaktyviųjų junginių išgavimui, o po ekstrakcijos reikia filtravimo ir tirpiklio pašalinimo procedūrų [74].

Nepolinių tuopų pumpurų bioaktyvių junginių išskyrimo taikant inovatyvų ir „žalią“ ekstrakcijos metodą superkritiniu anglies dvideginiu (SKE-CO<sub>2</sub>) tyrimai Europoje pradėti vykdyti labai neseniai tam panaudojant Lietuvoje ir šiaurės Europos šalyse yra gana retos ir nykstančios juodosios tuopos (*P. nigra*) pumpurus, kuriuose kai kurių bioaktyvių junginių kiekis yra mažesnis nei kitų rūšių tuopų pumpuruose [25]. Ekstrakcijai superkritiniais skysčiais yra naudojamos medžiagos, esančios būsenoje virš joms būdingo kritinio slėgio ir temperatūros [78]. Toks skystis pasižymi panašiomis į dujas difuzijos, klampumo ir paviršiaus įtempimo savybėmis, taip pat į skystį panašiu tankiu ir tirpumo galia [80]. Anglies dioksidas (CO<sub>2</sub>) tapo tinkamiausia medžiaga šiai ekstrakcijai atlikti dėl žemos kritinės temperatūros (31,1 °C) ir santykinai mažo kritinio slėgio (7,4 MPa). Tai netoksiškas, inertiškas, nedegus, nebrangus junginys bei klasifikuojamas kaip saugus ekstrahuojantis agentas. Be to CO<sub>2</sub> dujas galima pakartotinai panaudoti, taip sumažinant bendras proceso energijos sąnaudas ir išvengiant tirpiklių atliekų [80]. Ekstrakcijos procesas gali būti vykdomas žemose temperatūrose taip sumažinant bioaktyviųjų komponentų terminio skilimo galimybę. Nepaisant šių privalumų, polinių junginių ekstrakcijai šis nepolinis tirpiklis nėra tinkamas; polinių komponentų tirpumas ir proceso selektyvumas gali būti padidintas pridėdamas nedidelį kiekį (iki 5–10 %) polinių tirpiklių (modifikatorių), tokių kaip etanolis [67].

Kitas inovatyvus metodas naudojant suslėgtus skysčius vadinamas ekstrakcija padidintame slėgyje tirpikliais (EPS). Procesas vyksta esant padidintam slėgiui (100–140 atm) ir aukštai temperatūrai (40–200 °C) [74]. Aukštas slėgis padeda palaikyti tirpiklį skystoje būsenoje, o aukštoje temperatūroje padidinamas bioaktyviųjų junginių iš augalinės žaliavos išplovimo greitis. Tokiomis sąlygomis tirpiklis turi savybes, palankias ekstrahavimo procesui, taip pat pasiekiamas efektyvus tirpimo procesas ir skatinama analizuojamų medžiagų desorbcija iš augalinės žaliavos [81]. Nors metodas plačiai taikomas įvairių augalinių žaliavų ekstrahavimui, tačiau mokslinių tyrimų, kurių metu ši technika būtų pritaikyta tuopų pumpurams, nėra [82].

EPS sistemos technika yra paprasta ir lengvai pritaikoma laboratorijoje. Mėginys patalpintas į ekstrahavimo celę (5 pav.), pagamintą iš nerūdijančio plieno. Patekus tirpikliui į vidų, celė suslėgiama, pašildoma iki tam tikros temperatūros ir mėginys statiškai ekstrahuojamas. Celė praplaunama tirpikliu, o ciklas gali būti kartojamas. Kai ekstrahavimas baigiamas, suslėgtas azotas visą tirpiklį iš celės perkelia į talpą analizei. Ekstraktas filtruojamas, todėl nereikia atskiro filtravimo etapo. EPS plačiai naudojamas analitėms ekstrahuoti iš augalinių žaliavų, maisto ar aplinkos mėginių [83].



5 pav. EPS sistemos aparatūra

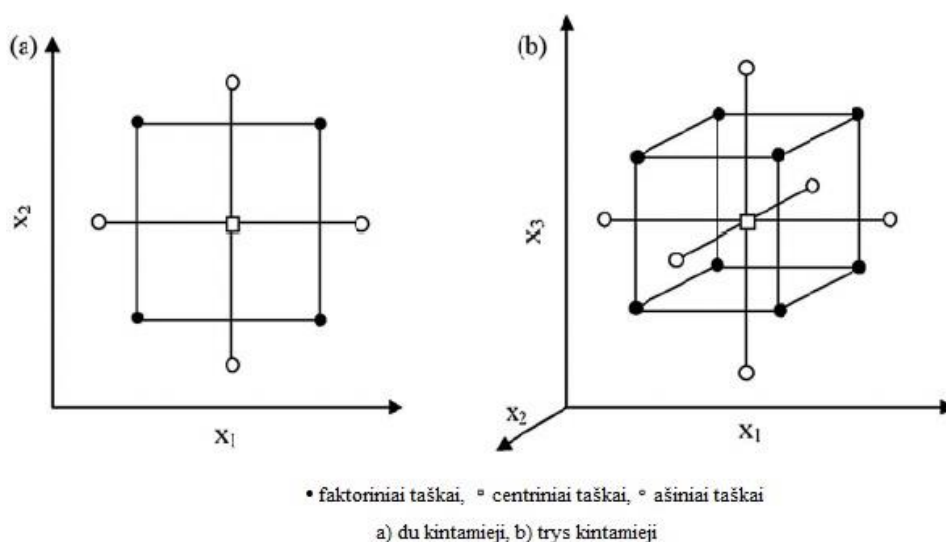
Ekstrakcija padidintame slėgyje tirpikliais turi keletą privalumų lyginant su klasikine ekstrakcija, įskaitant lengvą automatizavimą, trumpesnį analizės laiką, geresnį pakartojamumą, mažesnes darbo sąnaudas ir santykinai mažą reikiamą tirpiklio kiekį. Be to, pagreitinta ekstrakcijos sistema leidžia lengvai valdyti temperatūrą, slėgį, ekstrakcijos laiką ir ciklų skaičių [7]. Toks proceso optimizavimas gali padidinti junginių kiekį, išgautą iš augalinės žaliavos, o užprogramuota EPS įranga gali veikti be priežiūros. Tačiau esant aukštai ekstrakcijos temperatūrai, gali skilti augalinėje žaliavoje esantys termolabilūs junginiai. Optimalūs kintamųjų parametrai priklauso nuo ekstrahuojamųjų junginių rūšies. Taigi, tinkami proceso parametrai turi būti nustatyti eksperimentiniu būdu [74].

Racionalus ir tvarus įvairių augalinės kilmės žaliavų perdirbimas į aukštesnės pridėtinės vertės komponentus yra aktualus šio laikmečio iššūkis ir svarbi bioekonomikos dalis. Vienas iš pagrindinių šio proceso aspektų – efektyvių bioaktyvių medžiagų išskyrimo bei daugiapakopių beatliekių ekstrakcijos ir frakcionavimo procesų kūrimas ir taikymas kuriant inovatyvius šiuolaikinio vartotojo poreikius atitinkančius produktus, kurie gali būti panaudojami maistui, kosmetikai, buitinei chemijai gaminti, farmacijos srityje ir kitiems tikslams [84].

Vienas iš svarbiausių biorafinavimo uždavinių siekiant pagaminti bioaktyviais junginiais praturtintus produktus yra pasirinkto ekstrakcijos metodo parametru optimizavimas. Optimalios ekstrakcijos sąlygos gali ženkliai skirtis priklausomai nuo eksperimentams panaudotos augalinės žaliavos ar jos anatominės dalies tipo ir savybių, žaliavų paruošimo ekstrakcijos procesui būdo, ekstrakcijai parinkto tirpiklio, optimizavimui parinktų ekstrakcijos parametru tipo ir skaičiaus, siekiamo tikslo (pavyzdžiui, gauti didžiausią galimą ekstrakto išėigą, sukonzentruoti tikslinius tam tikromis funkcinėmis savybėmis pasižyminčius junginius ekstraktoje, keisti proceso energijos ar laiko sąnaudas ir kt.) [3]. Norint efektyviai šiuos uždavinius įgyvendinti tiek laboratoriniame, tiek pramoniname lygmenyje, ekstrakcijų procesams modeliuoti, optimizuoti ir validuoti yra naudojami įvairūs integruoti chemometriniai metodai, pavyzdžiui, atsako-paviršiaus metodologija (angl. RSM, *Response Surface Methodology*) grįstas eksperimentinis dizainas (angl. *DoE, Design of Experiments*) [9].

RSM yra vienas plačiausiai taikomų optimizavimo metodų ir apibrėžia nepriklausomų ekstrakcijos proceso kintamųjų (pavyzdžiui, slėgis, pH, temperatūra ar laikas), atskirai arba kartu, poveikį tiriamiesiems atsakams [3]. Modeliuojant ekstrakcijos procesą ir optimizuojant parametrus galima išskirti penkis etapus. Pirmasis etapas yra eksperimentinio plano parenkimas, kurio metu pasirenkami nepriklausomi ir priklausomi kintamieji bei nustatomi jų lygiai. Toliau atliekami eksperimentai pagal sudarytą planą. Trečio etapo metu atliekama nepriklausomų kintamųjų analizė, įvertinama jų įtaka priklausomų kintamųjų pokyčiams ir sudaromas proceso modelis. Ketvirtas etapas skirtas modelio analizei – atliekama statistinė ANOVA analizė ir modelio vizualizacija. Paskutinio etapo metu nustatomos optimalios ekstrakcijos sąlygos [85].

Dažniausiai eksperimentiniam dizainui sudaryti yra naudojamas centriškai kompozicinis planas (angl. *CCD, Central Composite Design*). Šį planą sudaro trijų tipų taškai: (1) faktoriai taškai, (2) centrinis taškas ir (3) ašiniai taškai, esantys  $\alpha$  atstumu nuo centrinio taško (6 pav.). Centriškai kompozicinis planas yra tinkamas nuosekliems eksperimentams atlikti ir leidžia nustatyti optimalias ekstrakcijos procesų sąlygas pastoviai tikslinei atsako vertei gauti, taip pat atsakui didinti arba mažinti tam taikant mažiausią galimą eksperimentų skaičių [86].



**6 pav.** Centriškai kompozicinis planas [87]

Atsako-paviršiaus metodologija yra plačiai naudojama maisto, biotechnologijų bei farmacijos pramonėse, sprendžiant daugiatislio bioaktyvių junginių ekstrakcijos optimizavimo uždavinius. Papildomai, pastaraisiais metais įvairūs dirbtinio intelekto įrankiai, pavyzdžiui, dirbtiniais neuroniniais tinklais (angl. *Artificial Neuron Network*) vis dažniau naudojamas ekstrakcijų procesų modeliavimui šalia atsako-paviršiaus metodologijos, o gauti modeliai parodė tvirtą koreliaciją su eksperimentų rezultatais [85].

Iki šiol literatūroje šaltiniuose yra aprašoma tik keletas mokslinių tyrimų, kurių metu atsako-paviršiaus metodologija buvo pritaikyta siekiant optimizuoti juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų ekstrakcijos superkritiniu  $\text{CO}_2$  procesą [3, 8]. Mokslinių tyrimų, pritaikant šią metodologiją kitiems tuopų pumpurų, įskaitant ir *P. balsamifera* ekstrakcijos metodams, nėra.

## 1.5. Tuopų preparatų panaudojimas

Europoje tuopų pumpurų gydomosios savybės pirmą kartą aprašytos 1597 metais, J. Gerard'o knygoje [88]. Ankstyvą pavasarį surinkti tuopų pumpurai tradicinėje medicinoje naudojami kaip antibakteriniai, priešgrybeliniai, priešuždegiminiai, karščiavimą mažinantys, greitinantys žaizdų gijimą ir atsikosėjimą gerinantys preparatai [3, 89]. Tuopų pumpurų preparatai naudojami paviršinėms odos traumoms, nušalimams ir odos nudegimams gydyti. Išoriškai naudojami preparatai taip pat ramina ir gydo kitas odos ligas ir sužeidimus (opos, sumušimai, įpjovimai ir spuogai), be to, tuopų pumpurų tinktūra palengvina laringito ir kitų kvėpavimo takų ligų simptomus. Balzaminiai tuopų (*P. balsamifera*) pumpurai tradicinėje medicinoje naudojami dermatologinių ir virškinamojo trakto problemoms gydyti [90].

Juodųjų tuopų (*P. nigra*) sėklos tradiciškai naudojamos gydant daugelį uždegiminių ligų, tokių kaip artritas, bronchitas ir kvėpavimo takų ligos [55], lapai ir žievė žinomi kaip antireumatiniai žoliniai vaistai [25]. Be to, žievė pasižymi tonizuojančiomis ir karščiavimą mažinančiomis savybėmis. Kaip diuretikas, jau nuo seno ji buvo vartojama gydant šlapimo takus [19].

Šiuo metu Lietuvoje registruota keletas vaistinių preparatų, kurių sudėtyje randama tuopų pumpurų ekstrakto. Geriamųjų lašų „Akutur“ sudėtyje yra 130 mg smulkiadantės tuopos (*P. tremuloides*) ekstrakto. Preparatas skirtas lengvo šlapimo takų uždegimo papildomam pagalbiniam gydymui po veiksmingos specifinės terapijos. „Homeovox“ dengtųjų tablečių sudėtyje yra 0,09 mg tuopų (*P. candicans*) ekstrakto. Tabletės skirtos trumpalaikiui užkimimui ir gerklės skausmui malšinti [91].

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Balzaminių tuopų pumpurai

Tyrimo objektas – balzaminių tuopų (*P. balsamifera*) išdžiovinti lapiniai pumpurai (7 pav). Augalinė žaliava įsigyta iš UAB „Jadvygos žolės“. *P. balsamifera* pumpurai buvo surinkti ir išdžiovinti 2019 metais.



7 pav. Balzaminių tuopų išdžiovinti pumpurai

### 2.2. Naudotos medžiagos

Diatominė žemė, 100 %  $\text{SiO}_2$  („Thermo Scientific“, JAV); Žemės ūkio kilmės etilo alkoholis, 96 % („Stumbras“, Kaunas, Lietuva); Metanolis,  $\geq 99,9$  % („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Acetonas,  $\geq 99,5$  % („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Troloksas, 97 % (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis) („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Azobis (2,2'-azobio (2-amidinpropano) dihidrochloridas) („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Fluoresceinas („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Folin-Ciocalteu reagentas, 2 M („Sigma-Aldrich“, Buchs, Šveicarija); ABTS<sup>+</sup> reagentas (2,2-azino-bis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas) („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Skruzdžių rūgštis,  $\geq 95$  % ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Acetonitrilas,  $\geq 99,9$  % ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Natrio chloridas ( $\text{NaCl}$ ) („Reachem“, Slovakija); Kalio chloridas ( $\text{KCl}$ ) („Reachem“, Slovakija); Natrio karbonatas, 98 % ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) („Chempur“, Lenkija); Natrio hidrofosfatas ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) („Reachem“, Slovakija); Kalio dihidrofosfatas ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) („Reachem“, Slovakija); Galo rūgštis ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ) („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Natrio dihidrofosfatas ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) („Sigma-Aldrich“, Japonija); DMSO,  $\geq 99,9$  % (dimetilsulfoksidas) („Sigma-Aldrich“, Steinheim, Vokietija); Kojo rūgštis ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$ ) („Sigma-Aldrich“, Jungtinė Karalystė); Tirozinazė, 7164 vnt/mg („Sigma-Aldrich“, JAV); L-DOPA,  $\geq 98$  % (Levodopa, 3,4-dihidroksifenilalaninas,  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4$ ) („Sigma-Aldrich“, JAV); Pinocembrinas,  $\geq 95$  % („Cayman Chemical Company“, JAV); Pinostrobinas,  $\geq 98$  % („Cayman Chemical Company“, JAV).

### 2.3. Balzaminių tuopų pumpurų ekstrakcija padidintame slėgyje (EPS)

Prieš ekstrakciją išdžiovinti balzaminių tuopų (*P. balsamifera*) pumpurai susmulkinami laboratoriniame cikloniniame malūne („Retsch“, Haan, Vokietija) naudojant 2 mm sietą. Kiekvienam eksperimentui atlikti analitinėmis svarstyklėmis Scaltec SPB31 („Goti“, Vokietija) pasveriamas

2,000±0,001 g sumaltos žaliavos ir sumaišoma su diatomine žeme, santykiu 1:1. Ekstrakcijos celė pripildoma pripildoma paruoštu augalinės žaliavos ir diatominės žemės mišiniu, abiejuose celės galuose įdedami celiuliozės filtrai („ThermoFisher Scientific“, Vilnius, Lietuva) ir užsukami dangteliai. Paruoštos celės patalpinamos į ekstraktorių, o tirpikliui skirta talpa pripildoma 96 % etanoliu. Ekstrakcijai atlikti naudota ASE-350 („Dionex Corporation“, Saniveilis, JAV) įranga. EPS-EtOH ekstrakcijos sąlygos: 40–80 °C temperatūra ir 15–45 min laikas, eksperimentai atliekami pagal sudarytą eksperimentinį planą (2.10 poskyris) ir pakartojami du kartus. Ekstrakcijų metu palaikomas pastovus 10,3 MPa slėgis.

EPS-EtOH liekana, gauta ekstrahuojant žaliavą nustatytomis optimaliomis sąlygomis, toliau buvo ekstrahuota subkrižiniu vandeniu (EPS-H<sub>2</sub>O). Pasirinktos ekstrakcijos sąlygos: 10,3 MPa slėgis, 110 °C temperatūra, 15–45 min laikas (3 ciklai po 5–15 min).

Gauti EPS-EtOH ekstraktai buvo sukonzentruoti išgarinant etanolį vakuuminiame rotaciniame garintuve „Biuchi R-U4“ (Šveicarija). Vanduo iš EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų buvo pašalintas liofilizuojant „Maxi-Dry Lyo“ (Danija) liofilizatoriumi. Sukonzentruoti ekstraktai laikomi tamsiuose buteliukuose, šaldiklyje, -18 °C temperatūroje. EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų išeigos išreikštos g/100 g TP.

#### **2.4. P. balsamifera pumpurų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimai**

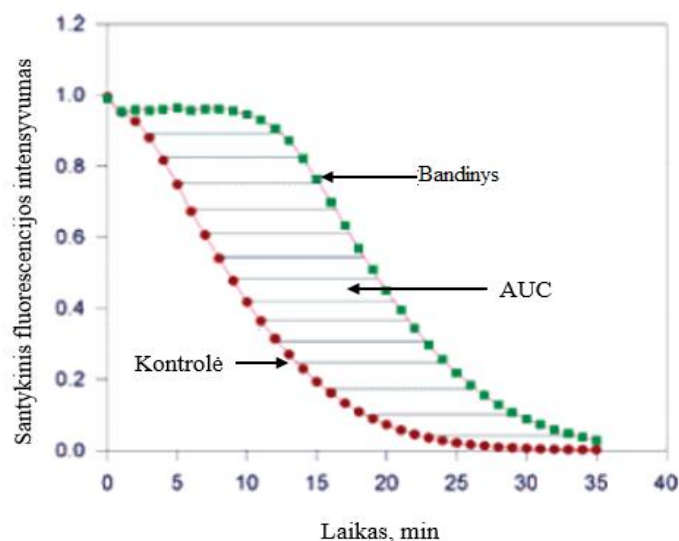
Antioksidacinio aktyvumo tyrimai atlikti naudojant praskiestus ekstraktus. Konzentruoti balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH ekstraktai ištirpinami ≥99,9 % metanolyje (MeOH), o EPS-H<sub>2</sub>O – distiliuotame vandenyje. Pasiruošiami pradiniai ekstraktų skiediniai, kurių koncentracija 10 mg/ml. Kiekvienos analizės metu šie pradiniai tirpalai dar praskiedžiami iki reikiamos koncentracijos.

##### **2.4.1. Deguonies radikalų sujungimo gebos nustatymas (ORAC)**

Metodas atliekamas pagal modifikuotą Prior'o ir kt. (2003) metodiką [92]. Pirmiausia paruošiamas fosfatinis buferinis PBS tirpalas (pH 7,4). Analitinėmis svarstyklėmis pasveriami 8,180±0,001 g NaCl, 1,420±0,001 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,270±0,001 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ir 0,150±0,001 g KCl. Visi reagentai ištirpinami 1 litre distiliuoto vandens, plokščiadugnėje kolboje.

Automatine pipete 25 μl *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (0,02 mg/ml MeOH) arba EPS-H<sub>2</sub>O (0,02 mg/ml H<sub>2</sub>O) ekstrakto arba tirpiklio (kontrolė) ir 150 μl fluoresceino tirpalo (14 μmol/l) supilama į 96 šulinėlių juodą nepermatomą plokštelę, uždengiama ir 15 minučių inkubuojama 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos, daugiakanale pipete į šulinėlius su bandiniais pilama po 25 μl paruošto azobio (AAPH) tirpalo (240 mmol/l PBS). Analizė atliekama FLOUstar Omega skaitytuvu („BMG LabTech“, Vokietija). Fluorescencija matuojama 120 ciklų po 1 min, 37 °C temperatūroje, sužadimas – 485 nm, emisija – 520 nm. Eksperimentai pakartoti tris kartus.

Kalibracinė kreivė sudaroma naudojant įvairių koncentracijų (50–500 μmol/l PBS) Trolokso tirpalus. Plotas po kalibracine kreive (angl. *AUC*, *area under the curve*) bandiniams apskaičiuojamas integruojant santykinę fluoresceino kreivę (8 pav.). Gauti rezultatai išreiškiami Trolokso ekvivalentais (mg TE/g E ir TP).



**8 pav.** ORAC antioksidacinis aktyumas, išreikštas plotu po kalibracine kreive [60]

AUC apskaičiavimui naudojama formulė:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} \frac{f_i}{f_0} \quad (1)$$

čia  $f_0$  – pradinė fluoresceino vertė (0 min);  $f_i$  – fluoresceino vertė tam tikrą laiką ( $i$ -tąją minutę).

Kalibracinės kreivės lygtis:

$$y = 0,1341x + 1,0327, R^2 = 0,9979 \quad (2)$$

čia  $x$  – Trolokso koncentracija,  $\mu\text{M}$ ;  $y$  – AUC.

#### 2.4.2. Bendrojo fenolinių junginių kiekio nustatymas (BFJK)

Tyrimas atliktas naudojant modifikuotą Singleton'o, Orthofer'o ir Lamuela-Raventos (1999) metodiką [93]. Folin-Ciocalteu reagentas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu, santykiu 1:9, o pradiniai EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O (10 mg/ml) ekstraktų tirpalai praskiedžiami distiliuotu vandeniu iki 0,2 mg/ml koncentracijos. Automatine pipete į 1,5 ml talpos mėgintuvėlį įpilama 150  $\mu\text{l}$  EPS-EtOH (0,2 mg/ml H<sub>2</sub>O) arba EPS-H<sub>2</sub>O (0,2 mg/ml H<sub>2</sub>O) ekstrakto arba distiliuoto vandens (kontrolė) ir 750  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu praskiesto tirpalo. Palaukiama 3 minutes ir į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 600  $\mu\text{l}$  7,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tirpalo. Paruošti tiriamieji bandiniai paliekami 2 valandoms tamsoje. BFJK nustatomas spektrofotometru Genesys 8 („Spectronic“) matuojant kiekvieno bandinio absorbciją esant 760 nm bangos ilgiui. Tyrimas pakartotas tris kartus.

Kalibracinė kreivė sudaroma naudojant įvairių koncentracijų (5–80  $\mu\text{g/ml}$ ) galo rūgšties vandeninius tirpalus. Gauti rezultatai išreiškiami galo rūgšties ekvivalentais (mg GRE/g E ir TP). Kalibracinės kreivės lygtis:

$$y = 0,0104x + 0,0185, R^2 = 0,9971 \quad (3)$$

čia  $x$  – galo rūgšties koncentracija,  $\mu\text{g/ml}$ ;  $y$  – skirtumas tarp bandinio ir kontrolės optinio tankio.

### 2.4.3. ABTS<sup>•+</sup> laisvųjų radikalų surišimo metodas

Šis metodas atliktas pagal modifikuotą Re ir kt. (1999) metodiką [94]. Analitinėmis svarstyklėmis pasveriami 0,055±0,001 g ABTS<sup>•+</sup> reagento ir praskiedžiama buferiniu PBS tirpalu (pH 7,4) 50 ml talpos plokščiadugnėje kolboje iki žymės. Paruoštas tirpalas paliekamas 16 valandų tamsoje. Praėjus šiam laikui, ABTS<sup>•+</sup> tirpalas skiedžiamas PBS, kol gaunama darbinio tirpalo absorbcija tampa lygi 0,700±0,010 optinio tankio vienetų, esant 734 nm bangos ilgiui.

1500 µl paruošto darbinio tirpalo mėgintuvėlyje sumaišoma su 25 µl EPS-EtOH (0,2 mg/ml EtOH) arba EPS-H<sub>2</sub>O (0,2 mg/ml H<sub>2</sub>O) ekstrakto arba distiliuotu vandeniu (kontrolė). Mėginiai paliekami 2 valandoms tamsoje. Bandinių absorbcija matuojama spektrofotometru esant 734 nm bangos ilgiui. Tyrimas pakartotas tris kartus.

Kalibracinė kreivė sudaroma panaudojant įvairių koncentracijų (0,25–1,25 mg/ml) Trolokso (poliniuose tirpikliuose tirpus sintetinis vitamino E analogas) tirpalus. Gauti rezultatai išreiškiami Trolokso ekvivalento antioksidaciniu aktyvumu (mg TE/g E ir TP). Kalibracinės kreivės lygtis:

$$y = 0,0638x - 1,3042, R^2 = 0,9977 \quad (4)$$

čia x – Trolokso koncentracija, µM; y – skirtumas tarp bandinio ir kontrolės optinio tankio, išreikštas procentais.

### 2.5. Antimikrobinio aktyvumo nustatymas

Antimikrobinis balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ir EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) ekstraktų aktyvumas buvo nustatytas naudojant difuzijos į agarą metodą, modifikuotą pagal Ložienės ir kt. (2007) metodiką [95]. Bakterijų *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739 ir *Escherichia coli* NTC 12900 kultivavimas atliekamas ant nuožulnaus agaro (plokštelių skaičiavimo agaras (PCA) (REF 610040, „Liofilchem“, Italija)) 37 °C temperatūroje, o mielių *Candida albicans* ATCC 90028 – ant nuožulnaus agaro iš DRBC agaro bazės (REF 610237, „Liofilchem“, Italija) 25 °C temperatūroje. Mitybinės terpės paruoštos pagal gamintojo rekomendaciją. Bakterijų ir mielių ląstelių suspensija paruošiama inokuliacijai naudojant 18 valandų augintas kultūras ir standartizuota pagal McFarland'o standartą Nr. 0,5 (1 × 10<sup>6</sup> kolonijas formuojančių vienetų 1 ml (cfu/ml)).

Tada 200 ml PCA mitybinės terpės inokuliuojama su 2 ml gauta bakterijų suspensija, o DRBS mitybinė terpė – su mielių suspensija. Į sterilias Petri lėkšteles išpilstoma po 12–15 ml inokuliuotos mitybinės terpės. Sukietėjus mitybinei terpei, kiekvienoje Petri lėkštelėje paruošiami trys šulinėliai (diametras 10 mm) ir į kiekvieną iš jų automatine pipete pilama po 25 µl EPS-EtOH (10–50 mg/ml (EtOH) arba EPS-H<sub>2</sub>O (10–50 mg/ml H<sub>2</sub>O) arba tirpiklio (kontrolė).

Petri lėkštelės su mikroorganizmų kultūromis inkubuojamos termostate, bakterijos – 37 °C, o mielės – 30 °C temperatūroje. Praėjus 24 valandoms, vertinamas tiriamųjų ekstraktų antimikrobinis aktyvumas, išmatuojant šulinėlius supančių sterilių zonų skersmenį (slopinimo zonos skersmuo + šulinėlio skersmuo). Vidutinė *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ir EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) ekstraktų slopinimo zona buvo apskaičiuota matuojant tris šulinėlius.

## 2.6. Tirozinazės inhibicijos gebos aktyvumas

Tyrimai atlikti pagal modifikuotą Grochowski ir kt. (2017) metodiką [96]. Pirmiausia pasiruošama 100 ml fosfatinio buferio (0,05 M, pH 6,8). Analitinėmis svarstyklėmis pasveriami 0,656 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ir 0,352 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Šie reagentai ištirpinami 80 ml distiliuoto vandens ir lašinant 1 M HCl tirpalą, Agilent Technologies 3200P pH metru nustatoma tirpalo galutinė pH vertė. Gautas tirpalas kolboje praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki žymės.

EPS-EtOH ekstraktai ištirpinami 25 % DMSO vandeniniame tirpale (0,025–0,5 mg/ml), o EPS-H<sub>2</sub>O – distiliuotame vandenyje (0,5–3,0 mg/ml). Automatinė pipetė į 96 šulinėlių skaidrią plokštelę pilama po 25 µl EPS-EtOH (0,025–0,5 mg/ml) arba EPS-H<sub>2</sub>O (0,5–3,0 mg/ml) ekstrakto arba tirpiklio (kontrolė), 40 µl 200 vnt/ml tirozinazės fermento buferinio tirpalo ir 100 µl fosfatinio buferio. Mėginiai 15 min. inkubuojami 25 °C temperatūroje. Po inkubacijos, į kiekvieną šulinėlį įpilama 40 µl 0,01 M L-DOPA tirpalo. Mėginiai vėl inkubuojami 25 °C temperatūroje, 9 minutes. Praėjus šiam laikui, absorbcijos matavimas atliekamas FLUOstar Omega spektrofotometru, esant 475 nm bangos ilgiui. Tyrimas pakartotas tris kartus.

Kalibracinė kreivė sudaroma naudojant įvairių koncentracijų (0–40 µg/ml) kojo rūgšties tirpalus. Gauti rezultatai išreiškiami kojo rūgšties ekvivalento aktyvumu (mg/g E ir TP). Kalibracinės kreivės lygtis:

$$y = 1,0296x + 8,8196, R^2 = 0,9938 \quad (5)$$

čia x – kojo rūgšties koncentracija, µg/ml; y – tirozinazės inhibicijos geba, išreikšta procentais.

## 2.7. Pinocembrino ir pinostrobino analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Analitinėmis svarstyklėmis Scaltec SPB31 („Goti“, Vokietija) pasveriami 0,020±0,001 g *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų. EPS-EtOH ekstraktas ištirpinamas ≥99,9 % metanolyje, o EPS-H<sub>2</sub>O – ultra švariame vandenyje „Milli Q“ iki 1 mg/ml koncentracijos. Visi mėginiai prieš analizę buvo filtruojami per 0,45 µm nailoninius švirkštinius filtras, kurių diametras 25 mm („Interchim“). Dihidroksiflavanono pinocembrino ir monohidroksiflavanono pinostrobino kiekybinė ir kokybinė analizė buvo atlikta naudojant „Shimadzu Nexera-i LC 2040C“ efektyviosios skysčių chromatografijos sistemą su fotodiodų matricos detektoriumi ir automatiniumi inektoriumi („Shimadzu Corporation“, Tokijas, Japonija). Junginiai chromatografiškai atskirti 30 °C temperatūroje naudojant „Supelcosil“ 3µ, C18, 120A, 150 × 4,60 mm kolonėlę („Sigma-Aldrich“, Bornemas, Belgija). Analizei naudotas tirpiklis A – „Milli Q“ vanduo, parūgštintas 0,1 % skruzdžių rūgštimi, o B tirpiklis – 0,1% acetonitrilas tiekiant į sistemą pastoviu 1,0 ml/min srautu, injekcijos tūris – 10 µl. Analizės metu naudotas gradientas buvo 0–1 min (10 % B); 1–5 min (10–50 % B), 5–15 min (50–80 % B), 15–17 min (80 % B), 17–21 min (80–10 % B) ir 21–23 min (10 % B). Gautos chromatogramos 200–500 nm bangos ilgiuose, o tiksliniams junginiams kiekybiškai įvertinti buvo naudojamos 288 nm chromatogramos. Kalibracinės kreivės sudarytos naudojant įvairių koncentracijų analitinius pinocembrino (10–100 µg/ml) ir pinostrobino (5–50 µg/ml) standartus; eksperimentai kartoti tris kartus.

Pinocembrino kiekio kalibracinės kreivės lygtis:

$$y = 28001x - 266785, R^2 = 0,992 \quad (6)$$

čia  $x$  – pinocembrino kiekis,  $\mu\text{g/ml}$ ;  $y$  – smailės plotas chromatogramoje.

Pinostrobino kiekio kalibracinės kreivės lygtis:

$$y = 27955x - 181841, R^2 = 0,9916 \quad (7)$$

čia  $x$  – pinostrobino kiekis,  $\mu\text{g/ml}$ ;  $y$  – smailės plotas chromatogramoje.

## 2.8. Chlorofilų a ir b bei bendro karotinoidų kiekio nustatymas

Pigmentų kiekio analizė atlikta pagal modifikuota Lichtenthaler'o ir Buschman'o (2001) metodiką [97]. Balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH ekstraktai ištirpinami acetone (10 mg/ml). Gauti tirpalai laikomi 10 minučių „Emag Technologies“ (Vokietija) ultragarso vonelėje ir centrifuguojami (10 min, 10 000 rpm) „Velocity 18R“ centrifuga. Tirpalų optinis tankis matuojamas spektrofotometru prie įvairių bangos ilgių: 470 nm, 645 nm, 662 nm ir 750 nm. Tyrimas pakartotas tris kartus.

Pigmentų (chlorofilų a ir b bei karotinoidų) kiekis apskaičiuojamas pagal formules:

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 11,24 * A_{662} - 2,04 * A_{645} \quad (8)$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 20,13 * A_{645} - 4,19 * A_{662} \quad (9)$$

$$C_{\text{karotinoidai}} (\mu\text{g/ml}) = (1000 * A_{470} - 1,9 * C_A - 63,14 * C_B)/214 \quad (10)$$

čia  $C_a$  – chlorofilo a koncentracija;  $C_b$  – chlorofilo b koncentracija;  $C_{\text{karotinoidai}}$  – karotinoidų koncentracija;  $A$  – optinis tankis prie atitinkamų bangos ilgių.

Praskiesti ekstraktų tirpalai turi būti visiškai skaidrūs, nes drumstas tirpalas sukelia didesnę absorbciją tarp 400 ir 800 nm. Drumstumas patikrinamas matuojant absorbciją esant 750 nm ( $A_{750}$ ) bangos ilgiui. Paruošus skaidrų tirpalą,  $A_{750}$  turėtų būti lygus nuliui, nes chlorofilas a ir b bei karotinoidai šiame spektre neabsorbuojami [98].

## 2.9. Lakiųjų junginių analizė

EPS-EtOH (78 °C, 18 min) *P. balsamifera* ekstrakto viršerdvėje lakiųjų junginių sudėtis buvo nustatyta kietafazės mikroekstrakcijos iš viršerdvės-dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu. Į 20 ml kietafazės mikroekstrakcijos (KME) buteliukus analitinėmis svarstyklėmis pasveriami 0,100±0,001 g *P. balsamifera* EPS-EtOH ekstrakto. Kietafazė mikroekstrakcija atliekama šiomis sąlygomis: temperatūra 60 °C, pusiausvyros trukmė 15 min, ekstrahavimo laikas 30 min, naudojant išsamiosios dujų chromatografijos sistemą (GC×GC-TOF-MS) „LECO“ Pegasus 4D, susidedančią iš „Agilent 7890A GC“ sistemos, „Gerstel“ daugiafunkcio mėginių paėmimo įrenginio („Gerstel GmbH“, Miulheimas, Vokietija) su TOF-MS detektoriumi („LECO“, Sent Džozefas, MI, JAV). Chromatografinę sistemą sudaro pirminė kolonėlė BPX-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ) („SGE Analytical Science“, Australija) susieta su antrine kolonėle BPX-50 („SGE Analytical Science“, 2,00 m, 0,10 mm, 0,1  $\mu\text{m}$ ). Analizės sąlygos: desorbcijos laikas 5 min; temperatūra keliami keliais etapais nuo 40 °C (sulaikymas 1 min) iki 130 °C (sulaikymas 10 min), esant 4 °C/min greičiui, vėliau iki 210 °C, esant 1 °C/min greičiui ir galiausiai iki 300 °C, esant 10 °C/min greičiui; modulatoriaus poslinkio temperatūra 5 °C, su 10 sek. moduliacijos periodu (karšto impulso trukmė 1,25 sek., vėsus laiko tarpas tarp etapų 3,75 sek.; aušintuvo temperatūra -80 °C); perdavimo linija į MSD 250 °C; dujų chromatografijos purkštuko angos temperatūra nustatyta 150

°C ir keliama iki 250 °C esant 20 °C/min greičiui; nešimo dujos (He) 1 ml/min; padalijimo santykis 1:20; TOF-MS greitis 10 spektrų/sek., masės diapazonas 30–500 m/z vienetai; detektoriaus įtampa 1550 V; jonų šaltinio temperatūra 250 °C.

Duomenys buvo apdoroti naudojant „ChromaTOF“ programinę įrangą v.4.22 („LECO“) po 400 sek. tirpiklio smailės uždelsimo. Lokieji junginiai nustatyti palyginus jų masės spektrus su Adams'o, NIST, MainLib ir Replib masės spektrų bibliotekomis (priimtini atitikmenys, jei signalo ir triukšmo santykis >50, o panašumas >750). Linijiniai sulaikymo indeksai (LRI) buvo apskaičiuoti naudojant C7–C30 n-alkanų serijų sulaikymo laiką ir palyginus su literatūros šaltinių duomenimis. Eksperimentai atlikti tris kartus. LRI apskaičiuojami pagal formulę:

$$LRI = 100 \left( n + \frac{Rt(s) - Rt(n)}{Rt(n+1) - Rt(n)} \right) \quad (11)$$

čia  $Rt(s)$  – nežinomo junginio sulaikymo laikas;  $Rt(n)$  – prieš junginį išeinančio alkano sulaikymo laikas;  $Rt(n+1)$  – po junginio išeinančio alkano sulaikymo laikas;  $n$  – prieš junginį išeinančio alkano anglies atomų skaičius.

## 2.10. *P. balsamifera* EPS-EtOH eksperimentinio plano sudarymas ir proceso optimizavimas

Eksperimentinis EPS-EtOH planas sudarytas taikant Design-Expert 12.0 programą, naudojant atsakopaviršiaus metodologiją su centriškai kompoziciniu planu. Pasirinkti ekstrakcijos proceso nepriklausomi kintamieji yra laikas ( $\tau$ , min) ir temperatūra ( $T$ , °C). Ekstrakcijos sąlygos: 40–80 °C temperatūra, 15–45 min laikas (3 ciklai po 5–15 min). Šie kintamieji užkoduoti trimis lygiais (–1, 0, +1), sudarytas 13 eksperimentų, esant skirtingoms ekstrakcijos sąlygomis, planas (3 lentelė).

**3 lentelė.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH optimizavimo eksperimentinis planas

Lygiai ir eil. Nr.	Temperatūra (T, °C)	Laikas ( $\tau$ , min)
Min. lygis (-1)	40	15
Vid. lygis (0)	60	30
Maks. lygis (+1)	80	45
1 (faktorinis)	40	45
2 (ašinis)	60	45
3 (ašinis)	60	15
4 (ašinis)	80	30
5 (faktorinis)	80	45
6 (centrinis)	60	30
7 (centrinis)	60	30
8 (ašinis)	40	30
9 (centrinis)	60	30
10 (faktorinis)	80	15
11 (centrinis)	60	30
12 (faktorinis)	40	15
13 (centrinis)	60	30

Pasirinkti šie *P. balsamifera* EPS-EtOH optimizavimo proceso priklausomi kintamieji: (1) EPS-EtOH ekstrakto išeiga; BFJK (bendras fenolinių junginių kiekis), mg GRE/g TP; (3) TEAG<sub>ORAC</sub> (deguonies radikalų sujungimo geba), mg TE/g TP; (4) BKK (bendras karotinoidų kiekis), µg/g TP, (5) chlorofilo a kiekis, µg/g TP; (6) chlorofilo b kiekis, µg/g TP; (7) BCK (bendras chlorofilų kiekis), µg/g TP; (8) pinocembrino kiekis, mg/g TP; (9) pinostrobino kiekis, mg/g TP.

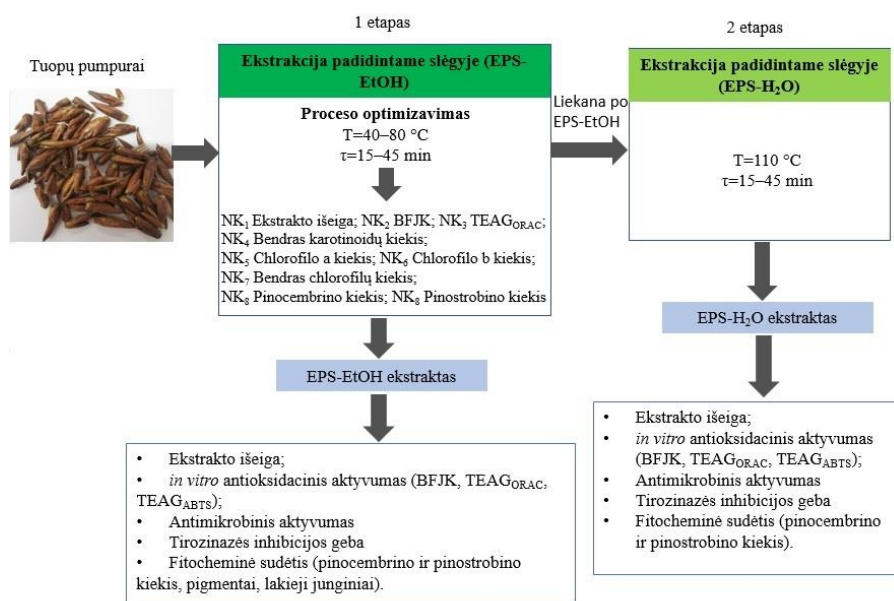
Gautų eksperimentinių duomenų modelių analizė atlikta Design-Expert 12.0 programa, įvertinant regresijos koeficientų ( $R^2$ ) vertes, Fišerio kriterijus (F), ANOVA analizės rezultatus bei modelio vizualizaciją (2D ir 3D atsako-paviršiaus kreivės).

### **2.11. Statistinė analizė**

Gautų duomenų vidutinės vertės ir standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti naudojant „Microsoft Excel 2016“ programą. GraphPad Prism 6.01“ programinė įranga buvo naudota nustatyti Pirsono (angl. *Pearson*) koreliacijos koeficientus ir statistiškai reikšmingus skirtumus tarp vidutinių verčių ( $p < 0,05$ ) taikant vienfaktorinę dispersinę analizę (angl. *one-way ANOVA*) ir Tukey's testą.

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Atlikta mokslinių tyrimų literatūros apžvalga parodė, kad *P. balsamifera* pumpurai yra mažai ištirti, taip pat trūksta mokslinių tyrimų apie inovatyvių ekstrakcijos procesų pritaikymą ir optimizavimą veikliųjų medžiagų išskyrimui iš tuopų pumpurų. Ekstrakcija padidintame slėgyje (EPS) tai visiškai automatizuotas procesas, leidžiantis tiksliai kontroliuoti proceso temperatūrą ir slėgį, o žaliava apsaugoma nuo šviesos ir deguonies poveikio. Metodas atitinka „žaliosios“ ekstrakcijos reikalavimus, todėl EPS technika yra tinkama bioaktyviųjų komponentų efektyviam išgavimui iš tuopų pumpurų. Be to, lyginant su tradiciniais metodais, sumažinamas ekstrahavimo laikas, energijos ir tirpiklio kiekio suvartojimas [7]. Tyrimo metu atlikta *P. balsamifera* pumpurų pakopinė ekstrakcija padidintame slėgyje, naudojant aplinkai ir žmogui draugiškus tirpiklius (EtOH ir H<sub>2</sub>O) ir optimizuotos procesų sąlygos (9 pav.).



9 pav. Pakopinės *P. balsamifera* pumpurų EPS eksperimentinių tyrimų schema

Optimalių ekstrakcijos sąlygų nustatymui naudota atsako-paviršiaus metodika su centriškai kompoziciniu planu, kuris tinkamas nuosekliems eksperimentams atlikti ir leidžia nustatyti optimalias ekstrakcijos procesų sąlygas taikant mažiausią galimą eksperimentų skaičių [86]. Eksperimentiniai duomenys apdoroti Design-Expert 12.0 programa.

#### 3.1. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH sąlygų optimizavimas

Tyrimo metu buvo optimizuoti du nepriklausomi EPS-EtOH kintamieji – temperatūra (T, °C) ir laikas (τ, min) naudojant atsako-paviršiaus metodologiją su centriškai kompoziciniu planu. Temperatūros intervalas svyravo nuo 40 °C iki 80 °C, o laiko – nuo 15 min iki 45 min. Optimizavimo parametru ribos buvo parinktos atsižvelgiant į tai, kad daugelis fenolinių junginių išlieka stabilūs iki 80-100 °C temperatūros, o EPS-EtOH parametru optimizavimas dažniausiai atliekamas 40–80 °C temperatūroje neviršijant 45-60 min ekstrakcijos trukmės [99, 100, 101]. EPS-EtOH metu išgaunami ekstraktai, kuriuose sukonzentruoti poliniai junginiai. Dėl 1.2 skyriuje aptartų fenolinių junginių savybių, įvairiomis EPS-EtOH sąlygomis (3 lentelė) gautų ekstraktų *in vitro* antioksidacinis atyvumas buvo įvertintas nustatant bendrą fenolinių junginių kiekį Folin-Ciocalteu's metodu bei deguonies radikalų sujungimo gebą ORAC metodu. Flavonoidams, tokiems kaip pinocembrinas ir pinostrobinas (10 pav.) būdingos antibakterinės, antivirusinės, priešgrybelinės, antioksidacinės ir priešuždegiminės



kitas formas (feofitinus). Šių junginių absorbcijos spektrai yra skirtingi, galutinis produktas nestabilus ir jo spalva laikui bėgant gali kisti [103].

### 3.1.1. Centriškai kompozicinis planas ir modelio analizė

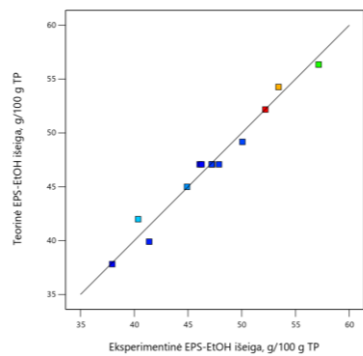
Naudojant Design-Expert 12.0 programą buvo sudaryta 13 bandymų skirtingomis ekstrakcijos sąlygomis (5 centriniai ir 8 faktoriai taškai). Eksperimentinė matrica ir gauti rezultatai pateikti 4 lentelėje ir 1 priede. Atlikus eksperimentus pagal sudarytą planą, nustatyta, kad taikant skirtingas EPS-EtOH sąlygas ekstraktų išeiga ženkliai kinta nuo 38,0 iki 57,5 g/100 g TP, BFJK – nuo 59,4 iki 87,9 mg GRE/g TP (atitinka 133,5–164,5 mg GRE/g E), TEAG<sub>ORAC</sub> vertės – nuo 1071,2 iki 1492,3 mg TE/g TP (2197,7–2859,4 mg TE/g E), BKK – nuo 72,8 iki 125,8 µg/g TP (184,1–235,4 µg/g E), chlorofilo a kiekis – nuo 24,9 iki 63,0 µg/g TP (65,6–110,6 µg/g E), chlorofilo b kiekis – nuo 15,1 iki 57,7 µg/g TP (60,8–104,4 µg/g E), o BCK – nuo 40,0 iki 120,7 µg/g TP (126,4–203,7 µg/g E), pinocembrino kiekis – nuo 7,5 iki 31,6 mg/g TP (18,4–55,3 mg/g E), o pinostrobino kiekis – nuo 3,2 iki 8,2 mg/g TP (atitinka 8,1–16,6 mg/g E). Lyginant teorines priklausomų kintamųjų vertes su tyrimo metu gautais eksperimentiniais rezultatais (12 pav.) matoma, jog atsakų eksperimentinės vertės yra nežymiai nutolusios nuo teorinio modelio. Galima teigti, kad gauti rezultatai atitinka teoriškai apskaičiuotus duomenis.

Šio tyrimo metu taip pat atlikta kiekvieno tiriamojo atsako modelio regresinė analizė. Rezultatai pateikti 5 lentelėje. Gauti duomenys rodo, kad ekstrakto išeiga ir chlorofilo a kiekis aprašomi linijiniu modeliu. Tai reiškia, jog didinant ekstrakcijos laiką ir temperatūrą, galima išgauti vis didesnę ekstrakto ir chlorofilo a kiekį. BFJK, TEAG<sub>ORAC</sub>, BKK bei chlorofilo b, pinocembrino ir pinostrobino kiekis aprašomi kvadratiniais (didinant proceso parametrų vertes, atsako vertė nusistovi), o BCK – dviejų veiksnių sąveikos (angl. *2FI, two-factor interaction*) modeliu. Apskaičiuotos modelio p-reikšmės (<0,05), klaidos tikimybės (>0,05) ir variacijos koeficientai (<3 %), parodė, jog dauguma modelių yra statistiškai reikšmingi. Tik apskaičiuota pinocembrino ir pinostrobino kiekio modelių klaidos tikimybė buvo mažesnė nei 0,05. Apskaičiuoti matematiniai modeliai atitinka gautus rezultatus, nes regresijos koeficientai ( $R^2$ ) yra gana aukšti ir artimi vienetui, jų vertės svyruoja nuo 0,969 iki 0,9962. Pinocembrino ir pinostrobino kiekio modelių regresijos koeficientai šiek tiek mažesni (0,9504 ir 0,9343, atitinkamai). Prognozuojami regresijos koeficientai yra statistiškai reikšmingi su koreguotais (skirtumas tarp jų verčių yra mažesnės nei 0,2), išskyrus pinocembrino ir pinostrobino modelius, kai šis skirtumas lygus 0,3778 ir 0,5054, atitinkamai. Adekvatumo preciziškumo santykinė reikšmė (angl. *Adeq. Precision*) parodo prognozuojamų verčių ir vidutinių prognozuojamų paklaidų palyginimą įvairiuose eksperimento taškuose. Pageidautina, jog šis santykis būtų didesnis nei 4. Taigi, gauti rezultatai rodo, jog *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto išeigos, BFJK, TEAG<sub>ORAC</sub>, BKK, chlorofilo a, chlorofilo b bei BCK modeliai gali būti naudojami modeliuojant EPS-EtOH ekstrakcijos eksperimentus. Pinocembrino ir pinostrobino atveju gauti didesni variacijos koeficientai (>7 %) rodo, kad tradicinio chemometrinio atsako-paviršiaus metodo galimybės, sprendžiant daugiatakslio bioaktyvių junginių ekstrakcijos optimizavimo uždavinius, gali būti ribotos. Pastarųjų metų užsienio mokslininkų darbuose junginių ekstrakcijų procesų modeliavimui šalia tradicinio atsako-paviršiaus metodo yra pasitelkiami dirbtiniai neuroniniai tinklai [85]. Tokie dirbtinio intelekto algoritmai galėtų būti taikomi ir *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH procesui optimizuoti, ypač siekiant tiksliau prognozuoti tikslinių bioaktyvių junginių išskyrimo rezultatus bei papildomai užtikrinti pastovius gautų ekstraktų kokybės rodiklius.

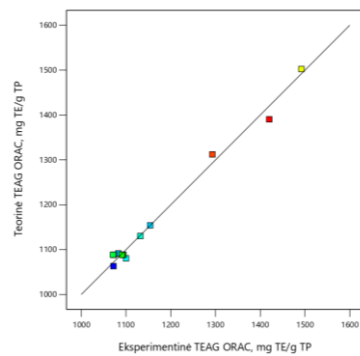
**4 lentelė.** P. balsamifera pumpurų EPS-EtOH temperatūros ir laiko įtaka ekstraktų išeigai, bendram fenolinių junginių kiekiui, in vitro deguonies radikalų sujungimo gebai, pigmentų (karotinoidų ir chlorofilų) bei tikslinių fenolinių junginių (pinocembrino ir pinostrobino) kiekiams

EPS-EtOH parametrai		Priklausomi kintamieji								
T, °C	τ, min	EPS-EtOH ekstrakto išeiga, g/100 g TP	BFJK, mg GRE/g TP	TEAG <sub>ORAC</sub> , mg TE/g TP	BKK, μg/g TP	Chlorofilo a kiekis, μg/g TP	Chlorofilo b kiekis, μg/g TP	BCK, μg/g TP	Pinocembrino kiekis, mg/g TP	Pinostrobino kiekis, mg/g TP
40	45	40,36±0,91	65,25±0,00	1154,06±118,25	77,61±0,03	35,46±0,26	26,85±0,11	62,31±0,37	20,64±1,26	6,29±0,11
60	45	50,06±0,70	66,81±1,87	1100,18±80,43	92,26±0,23	47,77±0,30	37,91±0,59	85,68±0,79	25,58±0,00	7,77±0,00
60	15	44,91±3,63	67,80±0,82	1132,05±78,12	96,73±0,15	42,79±0,29	34,53±0,13	77,33±0,42	8,27±0,00	3,65±0,08
80	30	53,42±2,83	87,90±0,93	1419,60±68,15	125,76±0,17	59,09±0,06	54,99±0,63	114,08±0,56	28,89±0,42	8,20±0,09
80	45	57,51±4,29	86,07±2,03	1292,76±4,96	105,19±0,15	63,00±0,37	57,70±1,05	120,70±1,42	31,60±0,18	8,12±0,04
60	30	46,26±0,32	72,00±1,17	1071,15±33,35	108,82±0,03	44,29±0,05	35,38±0,47	79,66±0,42	22,39±1,30	7,42±0,35
60	30	47,25±2,20	73,54±1,19	1093,85±33,66	111,15±0,03	45,23±0,06	36,13±0,48	81,37±0,43	21,93±0,00	7,33±0,00
40	30	41,39±0,27	64,47±0,92	1082,89±16,10	87,48±0,12	32,07±0,38	21,80±0,77	53,86±1,15	19,53±0,42	6,53±0,09
60	30	47,88±0,00	74,18±1,22	1091,42±2,63	112,63±0,03	45,84±0,06	36,62±0,49	82,45±0,43	23,17±1,34	7,68±0,36
80	15	52,19±1,28	80,25±0,00	1492,30±105,56	107,43±0,18	53,70±0,37	56,08±0,26	109,78±0,63	23,88±2,25	6,88±0,50
60	30	47,20±0,00	73,47±1,19	1092,70±33,63	111,03±0,03	45,19±0,06	36,10±0,48	81,28±0,43	22,84±1,32	7,57±0,35
40	15	37,95±0,93	59,39±1,08	1072,01±23,19	72,78±0,05	24,89±0,26	15,13±0,46	40,01±0,50	7,47±0,06	3,23±0,04
60	30	46,09±1,41	71,74±1,17	1073,22±37,22	108,42±0,03	44,12±0,05	35,25±0,47	79,37±0,42	23,22±0,00	7,63±0,00

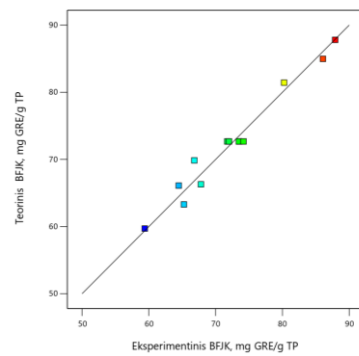
T – temperatūra; τ – laikas; EPS – ekstrakcija padidintame slėgyje; TP – tuopų pumpurai; GRE – galo rūgšties ekvivalentas; TE – Trolokso ekvivalentas; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; BKK – bendras karotinoidų kiekis; BCK – bendras chlorofilų kiekis; Vertės g/TP buvo apskaičiuotos įvertinus ekstrakto išeigą.



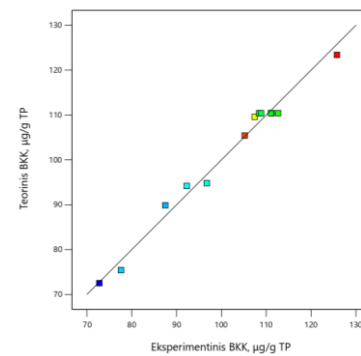
**A**



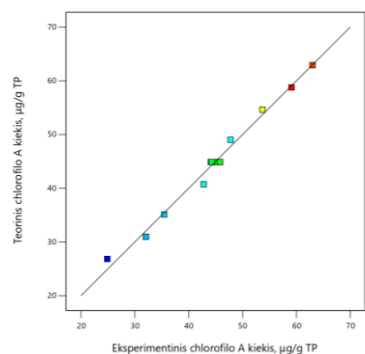
**B**



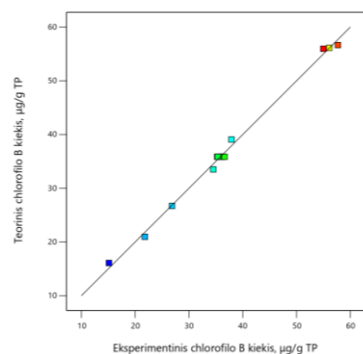
**C**



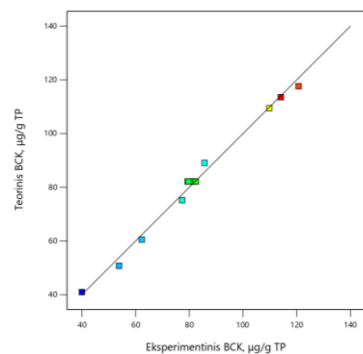
**D**



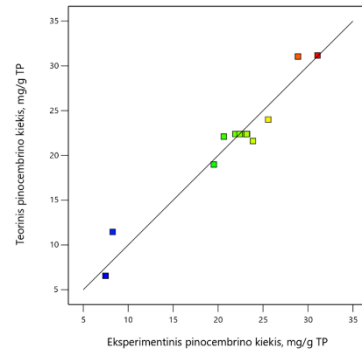
**E**



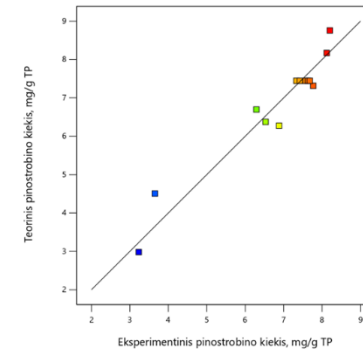
**F**



**G**



**H**



**I**

**12 pav.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH kiekvieno priklausomo kintamojo modelio teorinių ir eksperimentinių verčių palyginimas

**A** – EPS-EtOH išeiga; **B** – TEAG<sub>ORAC</sub>; **C** – BFJK; **D** – bendras karotinoidų kiekis; **E** – chlorofilo a kiekis; **F** – chlorofilo b kiekis; **G** – bendras chlorofilų kiekis; **H** – pinocembrino kiekis; **I** – pinostrobinio kiekis

5 lentelė. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH priklausomų kintamųjų modelių regresinė analizė

	EPS-EtOH ekstrakto išėiga	BFJK	TEAG <sub>ORAC</sub>	BKK	Chlorofilo a kiekis	Chlorofilo b kiekis	BCK	Pinocembrino kiekis	Pinostrobino kiekis
<b>Modelis</b>	Linijinis	Kvadratinis	Kvadratinis	Kvadratinis	Linijinis	Kvadratinis	2FI	Kvadratinis	Kvadratinis
<b>p-reikšmė</b>	<0,0001*	0,0073*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0055*	0,0468*	0,0158*	0,0047*
<b>F-kriterijus</b>	178,72	43,79	134,69	93,44	452,97	366,30	340,34	26,85	19,92
<b>Klaidos tikimybė</b>	0,2417**	0,0537**	0,0756**	0,1551**	0,1061**	0,0548**	0,0560**	0,0035*	0,0034*
<b>Regresijos koeficientas, R<sup>2</sup></b>	0,9728	0,9690	0,9897	0,9852	0,9891	0,9962	0,9913	0,9504	0,9343
<b>Koreguotas R<sup>2</sup></b>	0,9673	0,9469	0,9824	0,9747	0,9869	0,9935	0,9883	0,9151	0,8874
<b>Prognozuojamas R<sup>2</sup></b>	0,9454	0,7457	0,9228	0,8889	0,9776	0,9671	0,9711	0,5373	0,3820
<b>Adekv. prec. sant. reikšmė</b>	39,8282	21,5734	34,2705	31,1018	63,6400	58,1051	55,9183	18,3086	15,9323
<b>Standartinis nuokrypis</b>	0,9683	1,92	18,86	2,41	1,18	1,03	2,47	1,98	0,5337
<b>Vidurkis</b>	47,09	72,53	1166,77	101,33	44,88	37,27	82,14	21,45	6,79
<b>Variacijos koeficientas, %</b>	2,06	2,64	1,62	2,37	2,63	2,76	3,01	9,23	7,86

EPS-EtOH – ekstrakcija padidintame slėgyje etanoliu; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; BKK – bendras karotinoidų kiekis; BCK – bendras chlorofilų kiekis; \* - statistiškai reikšmingas kintamasis; \*\* – statistiškai nereikšmingas kintamasis; Adekv. prec. sant. reikšmė – adekvatumo preciziškumo santykinė reikšmė (angl. *Adeq. Precision*).

Kiekvieno modelio, gauto naudojant centriškai kompozicinį planą, ANOVA analizė pateikta 2 priede. Gauti rezultatai parodė, jog tiek temperatūra (T), tiek laikas ( $\tau$ ) yra statistiškai reikšmingi veiksniai balzaminų tuopų pumpurų ekstraktų išeigai ( $p < 0,05$ ). Remiantis Fišerio kriterijaus verte, kuri lygi 329,6 ir  $p$ -reikšme ( $< 0,0001$ ), temperatūra turi daug didesnę įtaką ekstrakto išeigai nei laikas ( $p = 0,0004$ ;  $F = 27,9$ ).

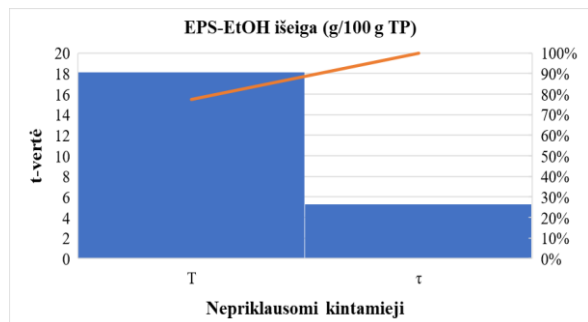
Ekstrahavimo temperatūra (T), temperatūros ir laiko kvadratiniai poveikiai ( $T^2$  ir  $\tau^2$ ) turėjo statistiškai reikšmingą įtaką BFJK vertėms ir išsidėsto šia tvarka: T ( $p < 0,0001$ ;  $F = 192,3$ ),  $\tau^2$  ( $p = 0,005$ ;  $F = 15,9$ ) ir  $T^2$  ( $p = 0,0076$ ;  $F = 13,8$ ). Parametrai T,  $\tau$ , tiesinė  $T\tau$  sąveika ir  $T^2$  yra statistiškai reikšmingi veiksniai TEAG<sub>ORAC</sub> vertėms ir išsidėsto šia tvarka: T ( $p < 0,0001$ ;  $F = 376,1$ ),  $T^2$  ( $p < 0,0001$ ;  $F = 180,4$ ),  $T\tau$  ( $p = 0,0001$ ;  $F = 55,5$ ) ir  $\tau$  ( $p = 0,0146$ ;  $F = 10,4$ ).

Toliau analizuojami pigmentų kokybinės ir kiekybinės sudėties modeliai. Nustatyta, jog T,  $T^2$  ir  $\tau^2$  yra statistiškai reikšmingi veiksniai bendram karotinoidų kiekiui ir išsidėsto šia tvarka: T ( $p < 0,0001$ ;  $F = 290,7$ ),  $\tau^2$  ( $p < 0,0001$ ;  $F = 120,4$ ) ir  $T^2$  ( $p = 0,0354$ ;  $F = 6,8$ ). Chlorofilo a kiekis tiesiogiai priklauso nuo T ( $p < 0,0001$ ;  $F = 832,0$ ) ir  $\tau$  ( $p < 0,0001$ ;  $F = 73,9$ ). Chlorofilo b kiekiui reikšmingi veiksniai išsidėsto šia tvarka: T ( $p < 0,0001$ ;  $F = 1739,3$ ),  $\tau$  ( $p = 0,0003$ ;  $F = 44,1$ ),  $T\tau$  ( $p = 0,0017$ ;  $F = 24,1$ ) ir  $T^2$  ( $p = 0,004$ ;  $F = 17,8$ ). BCK priklauso nuo T ( $p < 0,0001$ ;  $F = 968,5$ ),  $\tau$  ( $p < 0,0001$ ;  $F = 47,2$ ) ir  $T\tau$  ( $p = 0,0468$ ;  $F = 5,3$ ) parametru.

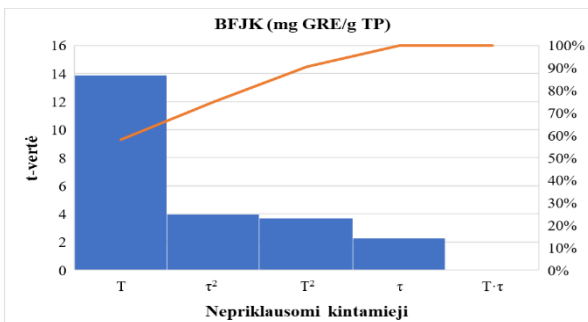
EPS parametrai temperatūra (T), laikas ir laiko kvadratinė sąveika ( $\tau$  ir  $\tau^2$ ) buvo reikšmingi veiksniai pinocembrino kiekiui ir išsidėsto šia tvarka:  $\tau$  ( $p = 0,0001$ ;  $F = 60,4$ ), T ( $p = 0,0001$ ;  $F = 55,7$ ) ir  $\tau^2$  ( $p = 0,0058$ ;  $F = 15,3$ ). Šie veiksniai taip pat turėjo statistiškai reikšmingą įtaką pinostrobino kiekiui ir išsidėsto tokia pat tvarka:  $\tau$  ( $p = 0,0004$ ;  $F = 41,5$ ), T ( $p = 0,0009$ ;  $F = 29,9$ ) ir  $\tau^2$  ( $p = 0,0020$ ;  $F = 22,9$ ).

Išanalizavus matematinius modelius (2 priedas), nustatyta, kad EPS temperatūra turėjo didžiausią įtaką priklausomiems kintamiesiems. Šią reikšmingą įtaką tiriamiesiems atsakams patvirtina ir Pareto grafikai (13 pav.). 13A pav. matoma, kad ~80 % ekstrakto išeigos priklauso nuo temperatūros poveikio. EPS-EtOH ekstraktų *in vitro* antioksidacinis aktyvumas taip pat labiausiai priklauso nuo temperatūros poveikio. BFJK temperatūra lemia ~57 %, likusių veiksnių poveikis pastebimai mažesnis (13B pav.), o parametrai T ir  $T^2$  lemia net ~75 % TEAG<sub>ORAC</sub> (13C pav.). 13D paveiksle pateiktame Pareto grafike matoma, kad BKK priklauso ne tik nuo temperatūros poveikio, bet ir nuo laiko kvadratinės sąveikos (T ir  $\tau^2$ ), abu šie parametrai lemia net ~85 % BKK. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH nepriklausomų kintamųjų įtaka chlorofilų kiekiui pateikta 13E–G paveiksluose. Chlorofilo a ir b kiekį bei BCK daugiausia lemia temperatūros pokytis (~78 %, ~74 % ir ~81 %, atitinkamai), o likusių veiksnių poveikis chlorofilų kiekiui žymiai mažesnis. Pareto grafikuose matoma, kad tikslinių junginių kiekiui ekstrakcijos laikas turėjo šiek tiek didesnę įtaką nei temperatūra. Pinocembrino kiekis ~35 % priklauso nuo ekstrakcijos laiko pokyčio, o ~67 % išgauto pinocembrino kiekio priklauso nuo laiko ir temperatūros pokyčio (13H pav.). Ekstrakcijos laiko pokytis taip pat ~35 % lemia išgauto pinostrobino kiekio, o parametrai laikas ir temperatūra kartu – ~65 % (13I pav.). Reikšminga temperatūros įtaka EPS ekstraktų išeigoms bei *in vitro* antioksidacinio aktyvumo vertėms buvo anksčiau aptarta ir kitų mokslininkų, ekstrahuojant įvairios kilmės augalines žaliavas ar šalutinius jų perdirbimo produktus, pavyzdžiui vaistinius augalus, uogų išspaudas ir kt. [84, 99].

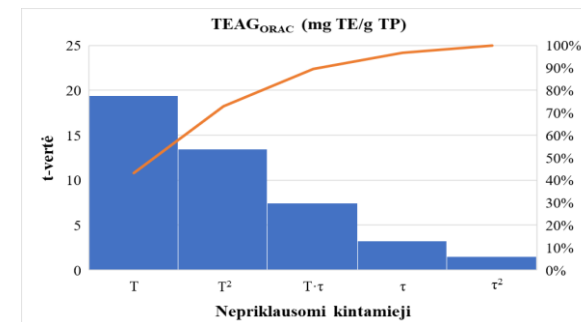
Prognozuojant atsako vertę, naudojama antrosios eilės polinomo regresijos lygtis pagal užkoduotus veiksnius. Tokia užkoduota lygtis apibūdina ryšį tarp priklausomų (T ir  $\tau$ ) bei nepriklausomų kintamųjų (tiriamųjų atsakų). Naudojant užkoduotus veiksnius, sudarytos 12–20 lygtys, atsakų vertėms prognozuoti.



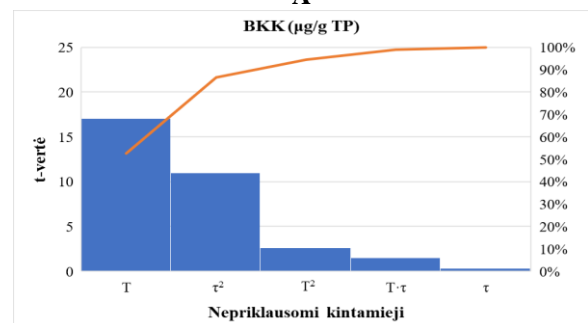
**A**



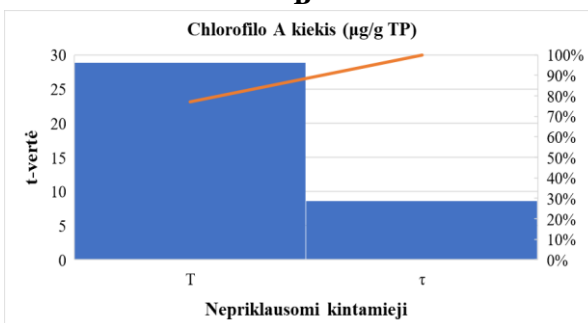
**B**



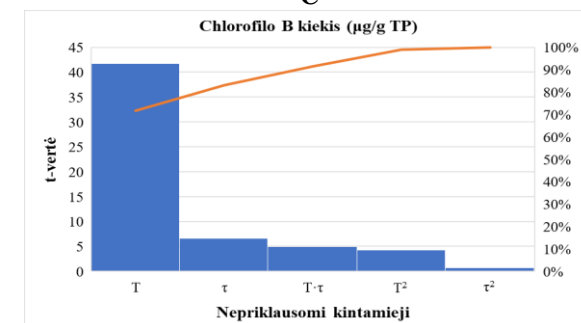
**C**



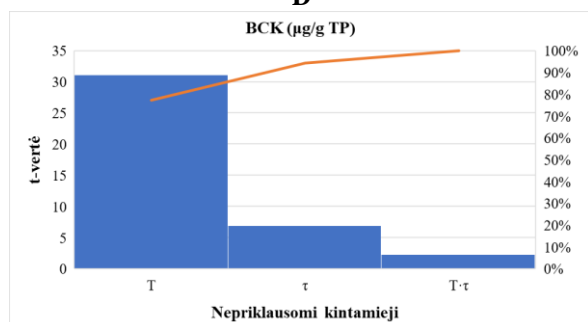
**D**



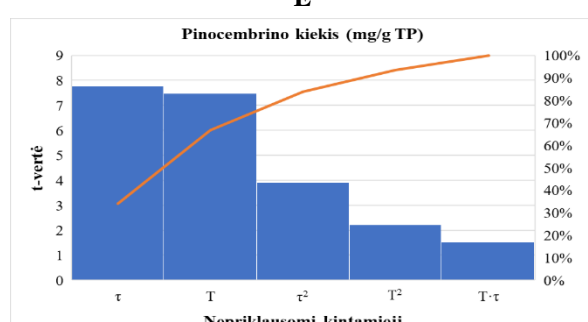
**E**



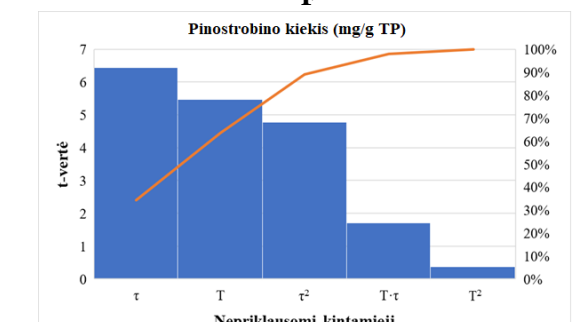
**F**



**G**



**H**



**I**

13 pav. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH parametų įtaka priklausomiems kintamiesiems pagal Pareto diagramas

**A** – EPS-EtOH išeiga; **B** – TEAG<sub>ORAC</sub>; **C** – BFJK; **D** – bendras karotinoidų kiekis; **E** – chlorofilo a kiekis; **F** – chlorofilo b kiekis; **G** – bendras chlorofilų kiekis; **H** – pinocembrino kiekis; **I** – pinostrobino kiekis

$$\text{Išeiga}_{\text{EPS-EtOH}} = 47,09 + 7,18 * T + 2,09 * \tau \quad (12)$$

$$\text{TEAG}_{\text{ORAC}} = 1088,59 + 149,33 * T - 24,83 \tau - 70,25 * T * \tau + 152,45 * T^2 + 16,95 * \tau^2 \quad (13)$$

$$\text{BFJK} = 72,68 + 10,85 * T + 1,78 * \tau - 0,01 * T * \tau + 4,28 T^2 - 4,60 \tau^2 \quad (14)$$

$$\text{BKK} = 110,40 + 16,75 * T - 0,3133 \tau - 1,77 * T * \tau - 3,77 * T^2 - 15,89 * \tau^2 \quad (15)$$

$$\text{Chlorofilo a kiekis} = 44,88 + 13,89 * T + 4,14 \tau \quad (16)$$

$$\text{Chlorofilo b kiekis} = 35,87 + 17,50 * T + 2,79 \tau - 2,52 * T * \tau + 2,61 * T^2 + 0,4307 * \tau^2 \quad (17)$$

$$\text{BCK} = 82,14 + 31,40 * T + 6,93 \tau - 2,84 * T * \tau \quad (18)$$

$$\text{Pinocembrino kiekis} = 22,39 + 6,03 * T + 6,28 * \tau - 1,50 * T * \tau + 2,63 * T^2 - 4,66 * \tau^2 \quad (19)$$

$$\text{Pinostrobinio kiekis} = 7,45 + 1,19 * T + 1,40 * \tau - 0,455 * T * \tau + 0,12 * T^2 - 1,54 * \tau^2 \quad (20)$$

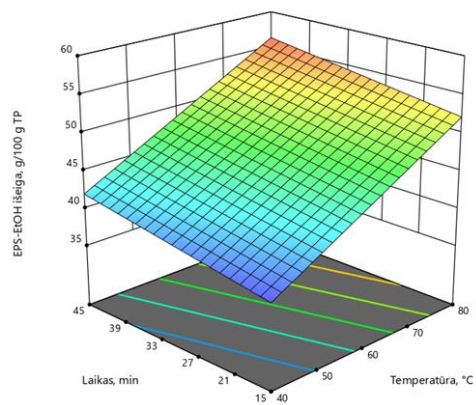
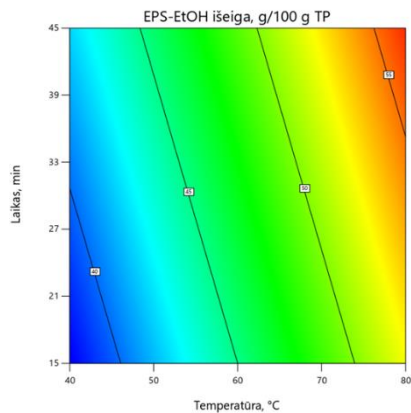
čia EPS-EtOH – ekstrakcija padidintame slėgyje etanoliu; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; BKK – bendras karotinoidų kiekis; BCK – bendras chlorofilų kiekis.

Remiantis koreliacijos matrica, kuri pateikta 3 priede, nustatyta stipri koreliacija ( $p < 0,0001$ ) tarp ekstrakto išeigos ir bendro chlorofilų kiekio ( $R^2 = 0,9759$ ) bei BFJK ( $R^2 = 0,9049$ ), tačiau  $\text{TEAG}_{\text{ORAC}}$  koreliacija su pinocembrino ir pinostrobinio kiekiu bei BKK buvo nereikšminga, o su BCK ( $R^2 = 0,7453$ ) – vidutinė ( $p = 0,001-0,01$ ). *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH koreliacija tarp nepriklausomų kintamųjų verčių, išreikštų gramui ekstrakto daugeliu atvejų buvo statistiškai nereikšminga dėl rezultatų išsibarstymo (4 priedas). Šie rezultatai parodė, kad *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstraktų aukštą *in vitro*  $\text{TEAG}_{\text{ORAC}}$  antioksidacinį aktyvumą lemia ekstrakte esantys įvairūs poliniai junginiai bei galimos jų sintergistinės ar antagonistinės sąveikos, todėl tęsiant šiuos tyrimus būtų tikslinga nustatyti ir kitus *P. balsamifera* pumpurų antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčius junginius (pavyzdžiui, *p*-kumaro rūgštis, pinobanksinas, chrizinas bei galanginas) [8], bei įvertinti EPS parametrų įtaką šių junginių ekstrakcijai iš tuopų pumpurų.

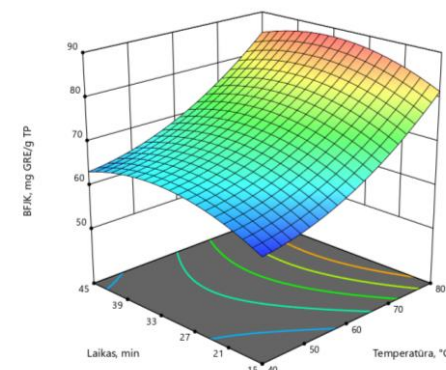
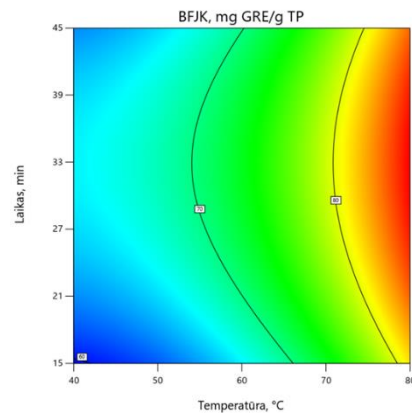
### 3.1.2. Atsako-paviršiaus grafikų analizė

Optimizuojant EPS-EtOH procesą taip pat buvo gauti atsako-paviršiaus 2D ir 3D grafikai, kurie vaizduoja nepriklausomų kintamųjų tarpusavio priklausomybės įtaką tiriamiesiems atsakams (14, 15 ir 16 pav.).

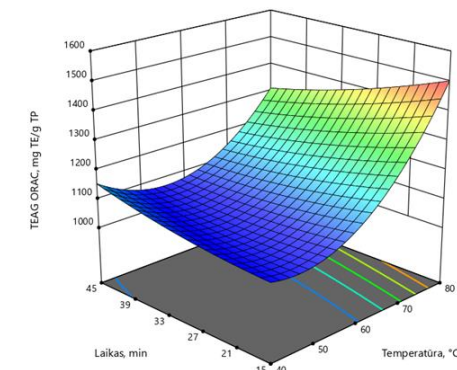
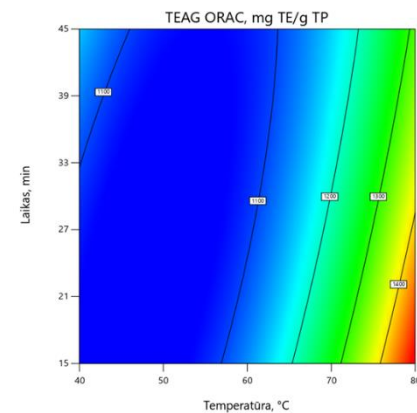
Remiantis 14A paveiksle pateiktu grafiku, matoma, jog temperatūrai padidėjus du kartus, ekstrakto išeiga padidėja 52 %, tačiau dėl linijinės priklausomybės, maksimali vertė pasiekama esant ilgiausiam ekstrakcijos laikui. Tuopų pumpurų *in vitro* antioksidacinei gebai temperatūra turi šiek tiek mažesnę poveikį. Didinant šį kintamąjį nuo 40 °C iki 80 °C, BFJK padidėja – 48 % (14B pav.), o  $\text{TEAG}_{\text{ORAC}}$  – 33 % (14C pav.). Priešingai nei ekstrakto išeiga,  $\text{TEAG}_{\text{ORAC}}$  vertė mažėja didėjant ekstrakcijos laikui, kai  $T > 65$  °C. Tiriant ekstrakcijos laiko poveikį BFJK ir BKK, 3D grafikuose matomas aiškus balno tipo išlinkimas.



**A**



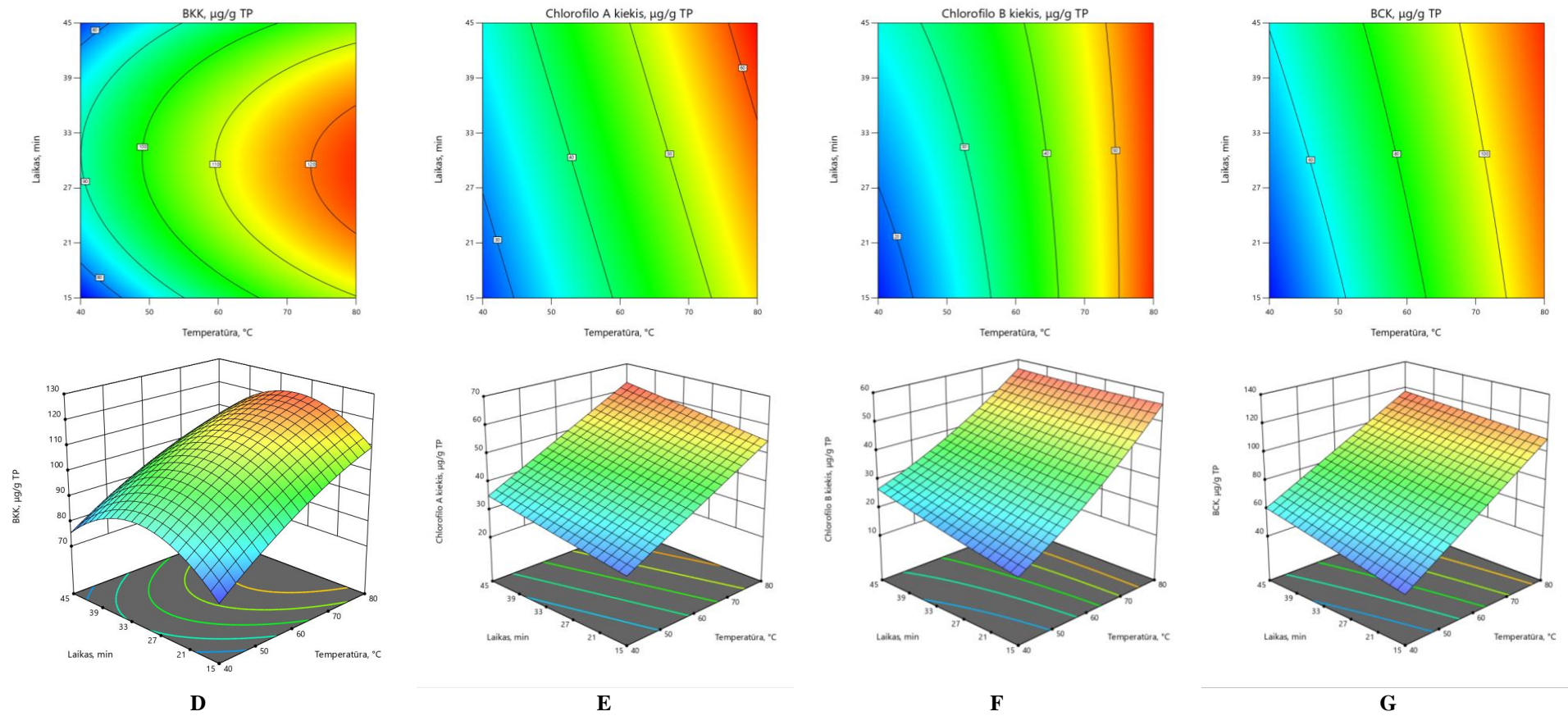
**B**



**C**

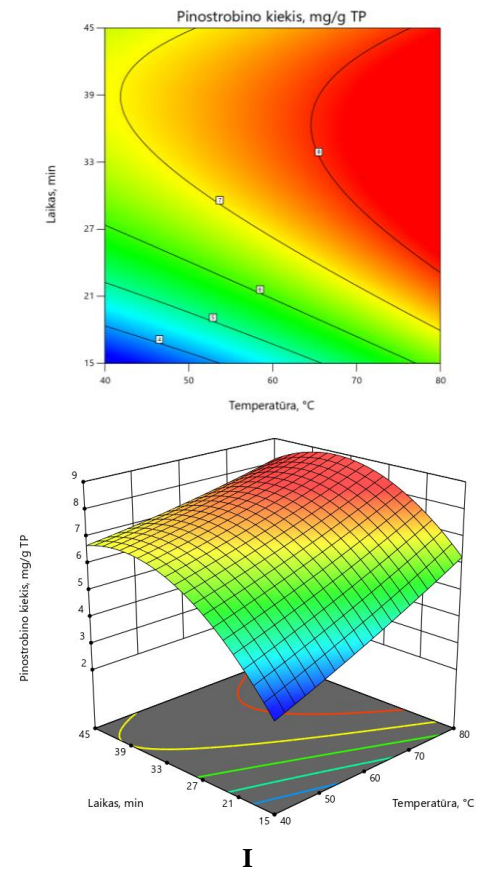
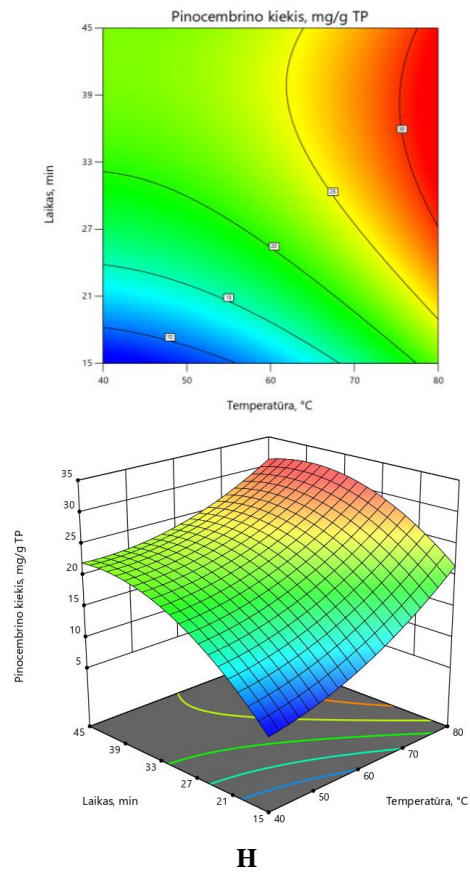
**14 pav.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH 2D bei 3D atsako-paviršiaus plotai, parodantys ekstrakto išeigos, BFJK ir TEAG<sub>ORAC</sub> priklausomybę nuo ekstrakcijos parametru

**A** – EPS-EtOH išeiga; **B** – BFJK; **C** – TEAG<sub>ORAC</sub>



**15 pav.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH 2D bei 3D atsako-paviršiaus plotai, parodantys pigmentų kiekio priklausomybę nuo ekstrakcijos parametrų

**D** – bendras karotinoidų kiekis; **E** – chlorofilo a kiekis; **F** – chlorofilo b kiekis; **G** – bendras chlorofilų kiekis



**16 pav.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH 2D bei 3D atsako-paviršiaus plotai, parodantys pinocembrino ir pinostrobin kiekio priklausomybę nuo ekstrakcijos parametru

**H** – pinocembrino kiekis; **I** – pinostrobin kiekis

Iš visų tiriamųjų atsakų, išgautų pigmentų kiekis labiausiai priklauso nuo temperatūros pokyčio. Remiantis 15 paveiksle pateiktais grafikais, nustatyta, jog temperatūrai padidėjus 2 kartus, BKK padidėja 73 % (15D pav.), chlorofilo a kiekis – 2,5 karto (15E pav.), chlorofilo b – net 3,8 karto (15F pav.), o BCK – 3 kartus (15G pav.). Chlorofilo a kiekis, kaip ir *P. balsamifera* EPS-EtOH ekstrakto išeiga, yra aprašomas linijiniu modeliu. Iš 15E paveiksle pateikto grafiko matoma, jog didžiausiam jo kiekiui išgauti, ekstrakcija reikia vykdyti bent 35 min ir >75 °C temperatūroje. Chlorofilo b kiekis mažiau priklauso nuo ekstrakcijos laiko. 15F paveiksle pateiktuose 2D ir 3D grafikuose matoma, jog didžiausias jo kiekis pasiekiamas esant aukščiausiai temperatūrai (>75 °C) per 15 min, o tęsiant ekstrakcijos procesą, chlorofilo b kiekis nekinta.

16 paveiksle pateiktuose grafikuose, matoma, kad pinocembrino ir pinostrobino kiekis daugiausia priklauso nuo ekstrakcijos laiko pokyčio. Didžiausias pinocembrino kiekis išgaunamas ekstrakciją atliekant daugiau nei 27 min (>75 °C) (16H pav.), o pinostrobino – esant >65 °C temperatūrai ir >25 min ekstrakcijos laikui (16I pav.)

### 3.1.3. Optimalių proceso sąlygų nustatymas ir ekstraktų charakterizavimas

Išanalizavus gautus rezultatus ir sudarytus matematinius modelius, buvo nustatytos optimalios *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH proceso sąlygos taikant daugiatislio optimizavimo funkciją (angl. *multi-response desirability function*). Optimizavimo kriterijai: taikant žemiausią galimą ekstrakcijos temperatūrą ir laiką, išgauti kuo didesnę ekstrakto kiekį, daugiau nei 1400,0 mg TE/g TP TEAG<sub>ORAC</sub> vertę ir daugiau nei 80,0 mg GRE/g TP BFJK (92–94 % nuo maksimalios vertės), taip pat išgauti kuo didesnę karotinoidų, pinocembrino bei pinostrobino kiekį ir sumažinti nepageidaujamą žalią spalvą ekstraktams suteikiančių chlorofilų kiekį. Naudojant Design-Expert 12.0 programą buvo nustatytos 78 °C temperatūros ir 18 min laiko *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH optimalios sąlygos ir iširta šio ekstrakto fitocheminė sudėtis ir *in vitro* antioksidacinis aktyvumas. Gauti rezultatai pateikti 6 lentelėje.

Palyginus 6 lentelėje gautus duomenis su 4 lentelės duomenimis, matoma, kad optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis išgaunamas didžiausias *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto kiekis (53,5 g/100 g TP), *in vitro* antioksidacine geba pasižyminčių junginių (BFJK – 79,7 mg GRE/g TP (148,5 mg GRE/g E), TEAG<sub>ORAC</sub> – 1459,9 mg TE/g TP (2820,6 mg TE/g TP), TEAG<sub>ABTS</sub> – 530,9 mg TE/g TP (993,2 mg TE/g E)) kiekis. Optimaliomis EPS-EtOH ekstrakcijos sąlygomis buvo pasiekta didžiausia karotinoidų išeiga (107,4 µg/g TP, atitinkamai 205,9 µg/g E) bei sumažintas nepageidaujamą žalią spalvą ekstraktams suteikiančių chlorofilų kiekis. Siekiant dar labiau sumažinti chlorofilų kiekį, tuopų pumpurų ekstrakciją reikėtų atlikti žemesnėje temperatūroje, tačiau tokiu atveju sumažėtų ir ekstrakto antioksidacinė geba. Tikslinio fenolinio junginio pinocembrino kiekis *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto buvo 50,1 mg/g E, atitinkantis 27,3 mg išgautus iš 1 gramo tuopų pumpurų, o pinostrobino – 13,1 mg/g E, atitinkamai 7,0 mg/g TP. Remiantis 5 priede pateiktomis pasikliautinio intervalo ribomis, matoma, kad visos *P. balsamifera* EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstrakto priklausomų kintamųjų vertės, išreikštos 1 gramui TP atitinka matematinį modelį ir pasikliautinio intervalo ribas.

**6 lentelė.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto, išgauto optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis, priklausomų kintamųjų vertės

<b>Rodikliai</b>		<b>EPS-EtOH (78 °C, 18 min)</b>
EPS-EtOH ekstrakto išeiga	g/100 g TP	53,46±0,56
<b><i>In vitro</i> antioksidacinis aktyvumas:</b>		
BFJK	mg GRE/g E	148,52±2,00
	mg GRE/g TP	79,74±1,07
TEAG <sub>ORAC</sub>	mg TE/g E	2820,62±220,38
	mg TE/g TP	1459,85±114,06
TEAG <sub>ABTS</sub>	mg TE/g E	993,15±29,40
	mg TE/g TP	530,93±15,72
<b>Pigmentų kokybinė ir kiekybinė sudėtis:</b>		
BKK	µg/g E	205,85±0,34
	µg/g TP	107,43±0,18
Chlorofilo a kiekis	µg/g E	97,71±0,00
	µg/g TP	52,24±0,00
Chlorofilo b kiekis	µg/g E	103,04±0,00
	µg/g TP	53,82±0,00
BCK	µg/g E	200,75±0,00
	µg/g TP	106,06±0,00
<b>Tikslinių fenolinių junginių kiekybinė sudėtis:</b>		
Pinocembrinas	mg/g E	50,12±0,51
	mg/g TP	27,29±0,28
Pinostrobinas	mg/g E	13,12±0,53
	mg/g TP	7,01±0,28

EPS-EtOH – ekstrakcija papildintame slėgyje etanoliumi; GRE – galo rūgšties ekvivalentas; TE – Trolokso ekvivalentas; TP – tuopų pumpurai; E – ekstraktas; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; BKK – bendras karotinoidų kiekis; BCK – bendras chlorofilų kiekis; Vertės g/TP buvo apskaičiuotos įvertinus ekstrakto išeigą.

Lyginant etanolinių ekstraktų išeigas su anksčiau publikuotais duomenimis, Bondar'o ir kt. atlikto tyrimo metu naudojant klasikinį perkoliacijos metodą buvo ekstrahuojami juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurai. Išgauto ekstrakto išeiga kinta nuo 49 iki 74 g/100 g TP naudojant 70–96 % etanolį, tačiau procesas vykdomas kelias paras, o tirpiklis nuolat tiekiamas į sistemą, todėl procesas nėra efektyvus laiko ir tirpiklių sąnaudų aspektu [66].

Kai kurių rūšių tuopų pumpurų *in vitro* antioksidacinis aktyvumas buvo tirtas anksčiau kitų mokslininkų. Pavyzdžiui, juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų etanoliniame ekstrakto, išgautame maceracijos metodu (24 val., 25–28 °C), BFJK siekia net 675 mg GRE/g E, t.y., net 4,5 karto daugiau nei šių tyrimų metu gauto *P. balsamifera* EPS-EtOH (78 °C, 18 min) BFJK vertė (148,5 mg GRE/g E) [104]. Havlik'as ir kt. taip pat ištyrė juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų ekstraktus, kurie buvo išgauti maceracijos metodu (24 val.). Atlikti tyrimai rodo, jog juodųjų tuopų pumpurų hidroetanolinių ekstraktų (20–80 % v/v) BFJK yra žymiai mažesnis (142–149 mg GRE/g E) ir labai panašus į 6 lentelėje nustatytą *P. balsamifera* EPS-EtOH ekstrakto BFJK [105]. Taip pat mokslinėje literatūroje

aprašomas dar vienas tyrimas, kai juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurai buvo ekstrahuoti etanoliumi, maceracijos metodu. Nustatytas BFJK 52 mg KE/g E, katechiną naudojant kaip standartą [54]. Kito tyrimo metu buvo palyginti *P. balsamifera* ir *P. nigra* pumpurų etanoliniai ekstraktai. Balzaminų tuopų pumpurų ekstrakto nustatytas didesnis BFJK (197 ir 95 mg *p*-kumaro rūgšties ekv./g, atitinkamai) [75]. Palyginti bendrą fenolinių junginių kiekį augalinėje žaliavoje sunku, nes nėra tarptautinio fenolinių junginių matavimo standarto, o tyrimuose naudojami skirtingi rūgščių ekvivalentai (pavyzdžiui, galo rūgšties, *p*-kumaro rūgšties, kavos rūgšties ir kt.) [106]. Zhang'as ir kt. tyrė tuopų (*Populus × canadensis*) pumpurų etanolinio ekstrakto, išgauto pramoniniu būdu, *in vitro* antioksidacinį aktyvumą. Nustatyta ABTS<sup>+</sup> sujungimo geba IC<sub>50</sub> = 55 µg/ml E, o TEAG<sub>ORAC</sub> – 1609 mg TE/g E, kuri yra 1,8 karto mažesnė nei šiuose tyrimuose naudoto *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto deguonies radikalų sujungimo geba (2820,6 mg TE/g E), kuri pateikta 6 lentelėje [107].

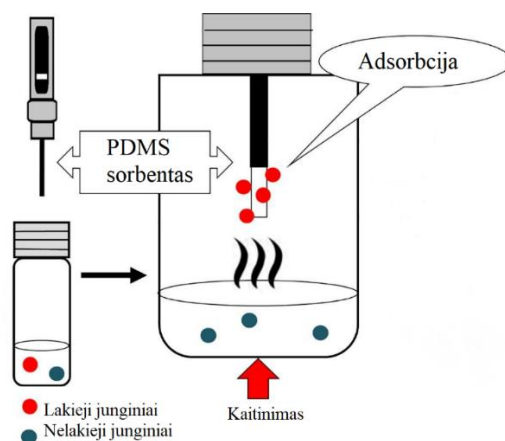
Duomenų apie balzaminės tuopos pumpurų pigmentų kokybinę ir kiekybinę sudėtį kol kas nėra. Ištyrus didžiosios tuopos (*P. deltoides*) pumpurų ekstraktą (tirpiklis 80 % acetonas) nustatytas 1 mg/g bendras karotinoidų kiekis, chlorofilo a – 2 mg/g, chlorofilo b – 1 mg/g, o bendras chlorofilų kiekis – 2 mg/g [108].

Tikslinių junginių kiekis ekstrakto priklauso nuo tiriamosios tuopos rūšies, pasirinkto ekstrakcijos proceso bei tirpiklio. Pavyzdžiui, Poblocka-Olech ir kt., ekstrahuojant žaliavą maceracijos būdu (metanoliumi), juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpuruose nustatė 11 mg/g TP pinocembrino ir 2 mg/g TP pinostrobino, o berlyninių tuopų (*P. x berolinensis*) pumpuruose – net 20 mg/g TP pinocembrino ir 25 mg/g TP pinostrobino [25]. Šiuose tyrimuose gauto *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstrakto tikslinių junginių kiekis, išreikštas gramui TP (6 lentelė), yra žymiai didesnis nei Poblocka-Olech ir kt. tirtuose *P. nigra* pumpuruose (2,5 karto daugiau pinocembrino ir 3,5 karto daugiau pinostrobino), o berlyninių tuopų (*P. x berolinensis*) pumpuruose kaupiamas panašus pinocembrino kiekis, tačiau pinostrobino aptikta net 3,6 karto daugiau nei *P. balsamifera* pumpuruose. Kus'as ir kt. atliko juodųjų tuopų pumpurų ekstrakciją superkriziniu anglies dioksidu (SKE-CO<sub>2</sub>). Ekstrahavimas buvo atliekamas esant skirtingam slėgiui (8–34 MPa) ir temperatūrai (36–64 °C). Pinocembrino kiekis pumpuruose svyruoja nuo 21 iki 47 µg/mg E, o pinostrobino – nuo 49 iki 80 µg/mg E [8]. Junginių kiekis yra žymiai mažesnis lyginant su šiuose tyrimuose gauto *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstrakto pinocembrino (50,1 mg/g E) ir pinostrobino (13,1 mg/g E) kiekiu, kuris pateiktas 6 lentelėje. Poblocka-Olech ir kt. nustatė aštuonių tuopų rūšių ir jų hibridų pumpurų fitocheminę sudėtį. Žaliava ekstrahuota metanoliumi, maceracijos būdu (60 °C, 45 min). Pinocembrino ir pinostrobino daugiausia rasta *Populus × canadensis* rūšies pumpuruose (18 ir 22 mg/g TP, atitinkamai) ir balzaminės tuopos pumpuruose (12 ir 22 mg/g TP, atitinkamai) [109].

Literatūroje nerasta tyrimų, kurių metu būtų atliktas balzaminų tuopų pumpurų EPS proceso parametrų optimizavimas. Analizuojant mokslinėje literatūroje pateiktus duomenis apie inovatyvių metodų taikymą kitų rūšių tuopų pumpurams ekstrahuoti, Kus'as ir kt. atliko juodųjų tuopų pumpurų ekstrakcijos superkriziniu anglies dvideginiu (SKE-CO<sub>2</sub>) parametrų optimizavimą, naudojant atsakopaviršiaus metodologiją. Nustatyti optimalūs ekstrakcijos parametrai buvo 30 MPa slėgis ir 60 °C temperatūra, išgaunant didžiausią ekstrakto, bendrą fenolinių ir tikslinių junginių kiekį bei FRAP (trivalentės geležies jonų redukavimo antioksidacinė galia) pajėgumą. Nepaisant to, tuopų pumpurų liekana po SKE-CO<sub>2</sub> toliau nebuvo ekstrahuojama poliškesniu tirpikliu siekiant išgauti kuo daugiau polinių komponentų iš augalinės žaliavos [8].

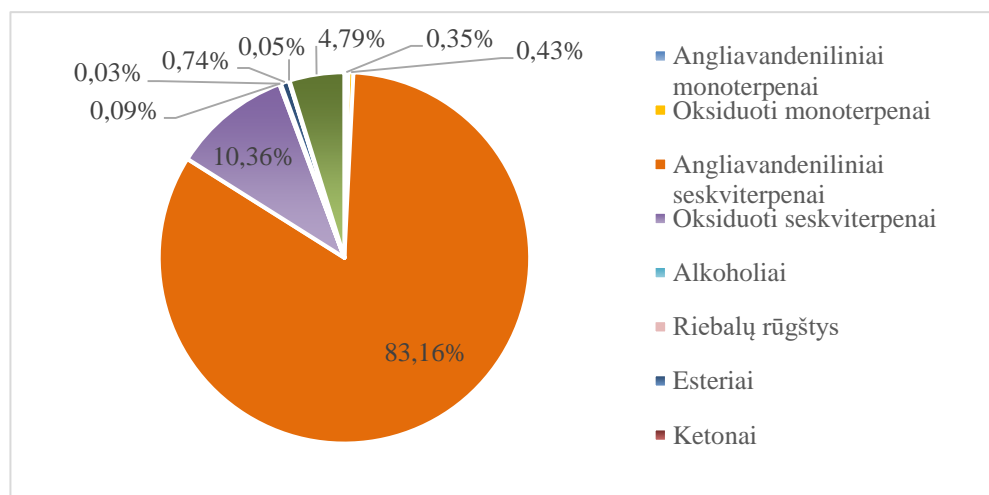
### 3.2. *P. balsamifera* EPS-EtOH ekstraktų viršerdvės lakiųjų junginių analizė

Gauti EPS-EtOH tuopų pumpurų ekstraktai pasižymėjo intensyviu ir aromatingu, tuopoms ir propoliui būdingu kvapu. Lokieji šio ekstrakto, išgauto optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis (78 °C, 18 min), junginiai buvo nustatyti kietafazės mikroekstrakcijos iš viršerdvės-dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu. Kietafazės mikroekstrakcijos (KME) metu ekstraktas veikiamas termiškai, o išsiskyrę lakieji junginiai absorbuojami iš ekstrakto viršerdvės ant adatos, padengtos PDMS (polidimetilsilaksano) sorbentu (17 pav.). Tada KME adata perkeliama į chromatografą desorbcijai ir atliekama lakiųjų junginių analizė. Tai plačiai naudojamas greitas, automatizuotas ir jautrus aromatinių junginių analizės metodas [110].



17 pav. Kietafazės mikroekstrakcijos schema [110]

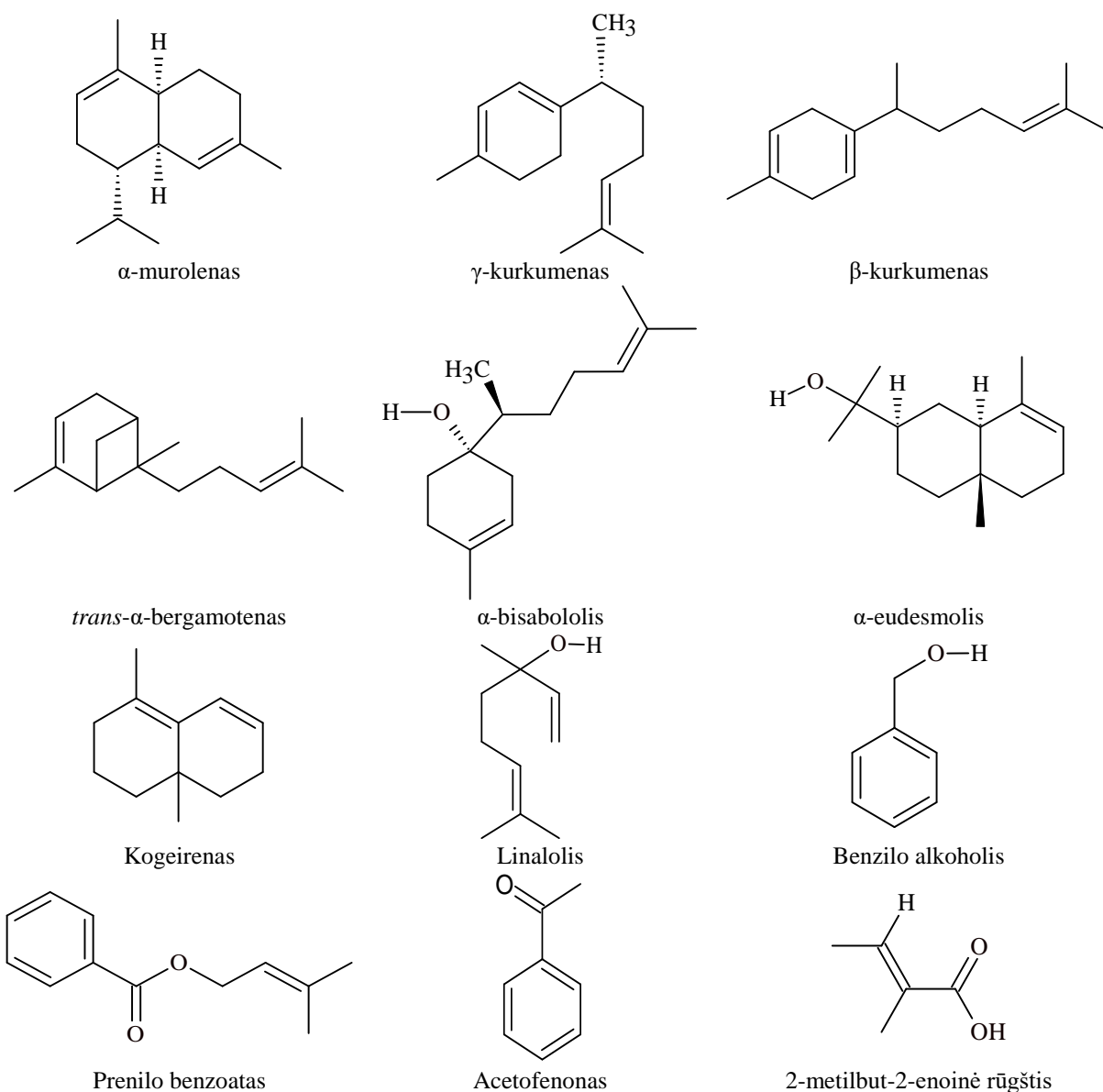
Lokieji junginiai identifiukuoti pagal smailės sulaikymo laiką, linijinį sulaikymo indeksą (LSI), tikslią junginių masę ir palyginti su anksčiau paskelbtais literatūros duomenimis. Gauti rezultatai pateikti 6 priede ir apibendrinti 18 paveiksle.



18 pav. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto viršerdvėje indentifikuotos lakiųjų junginių klasės

Balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH ekstrakto (78 °C, 18 min) viršerdvėje nustatyta 154 lakieji junginiai, iš kurių 99 identifiukuoti pilnai, o likę, atsižvelgiant į jų tikslią masę, priskirti atitinkamai junginių grupei. Pagrindinė EPS-EtOH ekstrakto viršerdvėje nustatyta lakiųjų junginių dalis priklauso angliavandeniliniams seskviterpenams, kurie sudaro net 83,2 % (19 pav.). Dominuojantys junginiai šioje klasėje yra  $\alpha$ -murolenas (8,6 %), suteikiantis ekstraktui medienos tipo aromatą,  $\gamma$ -

kurkumenas (7,3 %),  $\beta$ -kurkumenas (4,4 %) ir *trans*- $\alpha$ -bergamotenas (3,6 %), kuriam būdingas žolelių kvapas (6 priedas). Mažesnę junginių dalį sudaro oksiduoti seskviterpenai (10,4 %), iš kurių nustatytas didžiausias  $\alpha$ -bisabololio (4,2 %) ir  $\alpha$ -eudesmolio (1,6 %) kiekis. Šie junginiai suteikia gaių, saldų, citrusų bei gėlių aromatą. Ekstrakto viršerdvėje taip pat identifikuota angliavandenilinių bei oksiduotų monoterpenų, alkoholių, riebalų rūgščių, esterių ir ketonų klasės junginių, kurie sudaro iki 0,7 % bendro viršerdvės lakiųjų junginių kiekio (6 priedas). Pagrindinis junginys angliavandenilinių monoterpenų klasėje nustatytas kogeirenas (0,1 %), oksiduotų monoterpenų – linalolis (0,2 %), kuriam būdingas citrinų bei gėlių aromatas. Alkoholių klasėje pagrindinis junginys buvo benzilo alkoholis (0,1 %), o esterių – prenilo benzoatas (0,5 %). Šie junginiai ekstraktui suteikia gėlių, balzamo ir vaisių aromatą. Riebalų rūgščių ir ketonų ekstrakto viršerdvėje aptikta <0,05 %, o pagrindiniai junginiai indentifikuoti šiose klasėse buvo 2-metilbut-2-enoinė rūgštis ir acetofenonas, kuriems būdingas karamelės, gėlių ir migdolų kvapas (19 pav.).



**19 pav.** Pagrindiniai *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto viršerdvėje indentifikuoti lakieji junginiai

Anksčiau atliktų tyrimų metu Piochon-Gauthier ir kt. balzaminų tuopų pumpurų eteriniame aliejuje, gautame tradiciniu hidrodistiliacijos būdu (4 val., 60–240 min) identifikavo 50 junginių, o pagrindinis junginys nustatytas  $\alpha$ -bisabololis (18–68 %). Seskviterpenų kasės junginiai sudarė net 98–99 %

lakiųjų junginių, o monoterpenai – 1 % [111]. Taip pat ir šiuose tyrimuose naudoto *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstrakto viršerdvėje didžiąją dalį lakiųjų junginių sudarė seskviterpenai (93,5 %) (19 pav.). Juodųjų tuopų pumpurų eteriniame aliejuje Jerkovič'ius ir Mastelič'ius nustatė 48 lakiuosius junginius. Oksiduoti seskviterpenai  $\beta$ -eudesmolis ir  $\alpha$ -eudesmolis sudarė 26–29 % eterinio aliejaus. Kiti nustatyti pagrindiniai seskviterpenų klasės junginiai:  $\gamma$ -selinenas (8–9 %),  $\delta$ -kadinenas (8–9 %),  $\alpha$ -elemenas (3–5 %) ir  $\gamma$ -kadinenas (4 %). Monoterpenų aptikta 2–6 %, o alifatinių ir aromatinių alkoholių, alifatinių rūgščių identifikuota 10–14 % [19]. Juodųjų tuopų pumpurų ekstraktuose, išgautuose SKE-CO<sub>2</sub> metodu (36–64 °C, 12–34 MPa), nustatyti 88 junginiai. Šiuose ekstraktuose dominuoja pinostrobino chalkonas (14–21 %),  $\beta$ -eudesmolis (7–10 %),  $\alpha$ -eudesmolis (7–9 %), 2-metil-2-butenil-p-kumaratas (3–8 %), pentil-p-kumaratas (4–6 %),  $\gamma$ -eudesmolis (4–5 %) ir benzilsalicilatas (4–5 %) [3].

Be būdingų aromato savybių daugeliui seskviterpenų būdingas ir farmakologinis poveikis, pavyzdžiui, antimaliarinis, citotoksinis, priešgrybelinis, antibakterinis, antivirusinis, priešušdegiminis ir kt. [22]. Duomenų apie  $\alpha$ -muroleno savybes literatūroje nėra, tačiau šio junginio izomeras  $\gamma$ -murolenas, kurio balzaminių tuopų pumpurų ekstrakto rasta 1,0 % (6 priedas), pasižymi antibakteriniu aktyvumu prieš *Staphylococcus aureus* bakterijas [112]. Seskviterpenas  $\gamma$ -kurkumenas apibūdinamas kaip antioksidacinėmis savybėmis pasižymintis junginys, o  $\beta$ -kurkumenui būdingas antiproliferacinis poveikis vėžinėms ląstelėms [113, 114]. Duomenų apie *trans*- $\alpha$ -bergamoteno savybes literatūroje nepateikiama, tačiau *cis*- $\alpha$ -bergamotenas, kurio ekstrakto aptikta 1,8 % (6 priedas), prisideda prie antioksidacinių ir antimikrobinų balzaminių tuopų pumpurų ekstrakto savybių [114].  $\alpha$ -Bisabololis gerai žinomas oksiduotas seskviterpenas, kuris plačiai naudojamas kosmetikos gaminiuose dėl priešušdegiminio poveikio. Be to, bisabololis padidina veikliųjų medžiagų absorbciją per odą daugiau nei 20 kartų [115]. Piochon-Gauthier ir kt. atlikto tyrimo metu nustatytas  $\alpha$ -bisabololio citotoksinis aktyvumas *in vitro* sąlygomis prieš žmogaus plaučių karcinomos (A549) ir kolorektalinės adenokarcinomos (DLD-1) ląstelių linijas. Šis junginys pasižymi ryškiu aktyvumu (IC<sub>50</sub> = 14  $\mu$ g/ml) prieš abi vėžinių ląstelių linijas [111]. Costa ir kt. nustatė trijų eudesmolio izomerų ( $\alpha$ -,  $\beta$ - ir  $\gamma$ -) antimikrobinį poveikį. Mažiausia  $\alpha$ - ir  $\beta$ -eudesmolio slopinanti koncentracija nustatyta *Rhodococcus equi* gramneigiamoms bakterijoms (MSK 100 ir 125  $\mu$ g/ml, atitinkamai) ir *Candida albicans* mielėms (MSK 125  $\mu$ g/ml) [116]. Monoterpenui linaloliui būdingas gėlių tipo aromatas (6 priedas), todėl jis dažnai naudojamas kosmetikos pramonėje, kaip kvapą suteikiantis ingredientas. Linalolis taip pat būdingas priešušdegiminis, antiproliferacinis ir priešvėžinis, antimikrobinis, analgetinis bei neuroprotektinis poveikis [117]. Naujausių tyrimų duomenimis, nustatyta, kad sinergetinė linalolio,  $\alpha$ -eudesmolio ir  $\gamma$ -eudesmolio veikla slopina AKF2 (angiotenziną konvertuojantis fermentas) ir PDB6LU7 baltymus. AKF2 yra daugelyje ląstelių tipų ir audinių, įskaitant plaučius, širdį, kraujagysles, inkstus, kepenis ir virškinamąjį traktą. Virusas prieš patekdamas į ląsteles jungiasi su AKF2 receptoriu, o PDB6LU7 yra pagrindinė SARS-CoV2 proteazė, todėl šių baltymų slopinimas gali užkirsti SARS-CoV-2 patekimą į žmogaus kūną [118].

### 3.3. *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O sąlygų optimizavimas

Remiantis literatūros šaltinių duomenimis, po pirmojo ekstrakcijos etanolio etapo, augalinės žaliavos liekanose lieka sukonzentruotų bioaktyviųjų komponentų [119]. Todėl atlikus EPS-EtOH optimaliomis sąlygomis, balzaminių tuopų pumpurų liekana buvo dar kartą ekstrahuota subkriziniu vandeniu (EPS-H<sub>2</sub>O). Vanduo žinomas kaip pigus, „žalias“ ir idealus tirpiklis įvairiems bioaktyviems junginiams išskirti, veikiant slėgiui pasiekiantis subkrizinę būseną aukštesnėje nei 100 °C temperatūroje [120]. Šios būsenos vanduo pasižymi didesne bioaktyviųjų junginių tirpinimo geba,

mažesne klampa ir paviršiaus įtempiu, todėl žaliavos ekstrahavimo laikas sutrumpėja. Ekstrakcijos temperatūra (110 °C) ir laikas (15–45 min) buvo parinkti remiantis anksčiau publikuotais duomenimis apie įvairios kilmės augalinių žaliavų EPS-H<sub>2</sub>O proceso optimizavimą [84, 99]. Aukštesnėje nei 110 °C temperatūroje bioaktyvieji junginiai gali skilti, ekstraktas gali įgauti degintos karamelės kvapą ir gelsvą atspalvį dėl nefermentinio rudavimo reakcijos (Mailard'o reakcija) [121].

Išgavus tuopų pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktus buvo nustatyta jų išeiga, *in vitro* antioksidacinė geba (BFJK, TEAG<sub>ORAC</sub> ir TEAG<sub>ABTS</sub>) bei tikslinių junginių (pinocembrinas ir pinostrobinas) kiekis. Gauti rezultatai pateikti 7 lentelėje.

**7 lentelė.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų nustatytos priklausomų kintamųjų vertės

EPS-H <sub>2</sub> O parametrai		EPS-H <sub>2</sub> O I	EPS-H <sub>2</sub> O II	EPS-H <sub>2</sub> O III
		110 °C, 15 min	110 °C, 30 min	110 °C, 45 min
<b>Rodikliai</b>				
EPS-H <sub>2</sub> O ekstrakto išeiga	g/100 liekanos po EPS-EtOH	14,76±0,25 <sup>a</sup>	17,05±1,78 <sup>a</sup>	15,66±0,13 <sup>a</sup>
	g/100 g TP	6,87±0,12 <sup>a</sup>	7,94±0,83 <sup>a</sup>	7,29±0,06 <sup>a</sup>
<b><i>In vitro</i> antioksidacinis aktyvumas:</b>				
BFJK	mg GRE/g E	106,85±2,91 <sup>b</sup>	90,99±3,89 <sup>a</sup>	87,50±2,20 <sup>a</sup>
	mg GRE/g TP	7,34±0,20 <sup>b</sup>	7,22±0,31 <sup>b</sup>	6,38±0,16 <sup>a</sup>
TEAG <sub>ORAC</sub>	mg TE/g E	1036,24±50,51 <sup>a</sup>	967,88±41,54 <sup>a</sup>	996,89±185,86 <sup>a</sup>
	mg TE/g TP	71,19±3,47 <sup>a</sup>	77,89±3,34 <sup>a</sup>	72,64±13,54 <sup>a</sup>
TEAG <sub>ABTS</sub>	mg TE/g E	560,84±14,98	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>
	mg TE/g TP	38,53±1,03	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>
<b>Tikslinių fenolinių junginių kiekybinė sudėtis:</b>				
Pinocembrinas	mg/g E	2,59±0,14 <sup>c</sup>	1,42±0,03 <sup>b</sup>	1,36±0,00 <sup>a</sup>
	mg/g TP	0,18±0,01 <sup>c</sup>	0,11±0,00 <sup>b</sup>	0,10±0,00 <sup>a</sup>
Pinostrobinas	mg/g E	– <sup>N</sup>	– <sup>N</sup>	– <sup>N</sup>
	mg/g TP	– <sup>N</sup>	– <sup>N</sup>	– <sup>N</sup>

–<sup>n</sup> – neiširta; –<sup>N</sup> – nenustatyta; EPS-H<sub>2</sub>O – ekstrakcija padidintame slėgyje subkriziniu vandeniu; GRE – galo rūgšties ekvivalentas; TE – Trolokso ekvivalentas; TP – tuopų pumpurai; E – ekstraktas; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; Vertės g/TP buvo apskaičiuotos įvertinus ekstrakto išeigą; Skirtingos viršutinio indekso raidės žymi reikšmingus skirtumus tarp verčių eilutėje (vienfaktorinė dispersinė analizė ANOVA ir Tukey testas, p < 0,05).

Iš 7 lentelėje pateiktų duomenų matoma, jog keičiant EPS-H<sub>2</sub>O sąlygas, gautos atsakų vertės kinta nežymiai. Ekstrahuojant balzaminių tuopų pumpurų likučius subkriziniu vandeniu (EPS-H<sub>2</sub>O) buvo papildomai išskirta 6,9–7,9 g/100 g TP polinių komponentų. Šis kiekis yra 5,5–7,3 kartus mažesnis nei *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstraktų išeiga (38,0–57,5 g/100 g TP). EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų BFJK siekė 87,5–106,9 mg GRE/g E (atitinkamai 6,4–7,3 mg GRE/g TP), tai yra 1,5 karto mažesnis kiekis nei EPS-EtOH ekstraktų (133,5–164,5 mg GRE/g E, atitinkamai 59,4–87,9 mg GRE/g TP). EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų TEAG<sub>ORAC</sub> aktyvumas (967,9–1036,2 mg TE/g E, atitinkamai 71,2–77,9 mg TE/g TP) sumažėjo 2,3–2,8 karto lyginant su EPS-EtOH ekstraktais (2197,7–2859,4 mg TE/g E, atitinkamai 1071,2–1492,3 mg TE/g TP). EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktuose tikslinio junginio pinocembrino nustatytas kiekis buvo net 13,5–21,4 kartus mažesnis nei EPS-EtOH (1,4–2,6 mg/g E, atitinkantys 0,10–0,18 mg/g TP), o pinostrobinas neaptikta.

Keičiant *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O sąlygas, išgautų ekstraktų priklausomų kintamųjų vertės kito nežymiai, o skirtumai tarp vidutinių verčių daugeliu atvejų buvo statistiškai nereikšmingi. Reikšmingas skirtumas nustatytas tik tarp EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų, išgautų skirtingomis sąlygomis, BFJK ir pinocebino kiekio verčių, o daugiausia šių komponentų sukonzentruojama EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) ekstrakto (7 lentelė). Dėl šių priežasčių nustatyta optimalios *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O sąlygos: 110 °C temperatūra ir 15 min laikas. Nustatytais optimaliomis EPS-H<sub>2</sub>O sąlygomis (110 °C, 15 min) išskirto ekstrakto papildomai išmatuota ABTS<sup>++</sup> sujungimo geba siekė 560,8 mg TE/g E, o įvertinus ekstrakto išeią – 38,5 mg TE/g TP.

Mokslinių duomenų kiekis apie tuopų pumpurų vandeninių ekstraktų savybes literatūroje ribotas. Plačiau ištirtas tik *in vitro* antioksidacinis ekstraktų aktyvumas, o duomenų apie tikslinių junginių kiekį nerasta. Dudonne ir kt. atliktas tyrimas rodo, jog juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų vandeninio ekstrakto TEAG<sub>ORAC</sub> aktyvumas siekia 676 mg TE/g E, o BFJK – 180 mg kavos rūgšties ekv./g E [23]. Lyginant minėtus rezultatus su šiuose moksliniuose tyrimuose gautais duomenimis (7 lentelė), galima matyti, jog *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų deguonies radikalų sujungimo geba yra iki 1,5 karto didesnė nei aptarto *P. nigra* bandinio (968–1036 mg TE/g E lyginant su 676 mg TE/g E). Taip pat literatūroje pateikiama juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų vandeninės etilacetato ir vandeninės chloroformo frakcijos, išgautų tradiciniu maceracijos metodu, BFJK (44 ir 114 mg katechino ekv./g E, atitinkamai), tačiau šiuos rezultatus palyginti su 7-oje lentelėje pateiktais duomenimis yra sudėtinga dėl skirtingų standartinių junginių naudotų BFJK kiekiui apskaičiuoti [54].

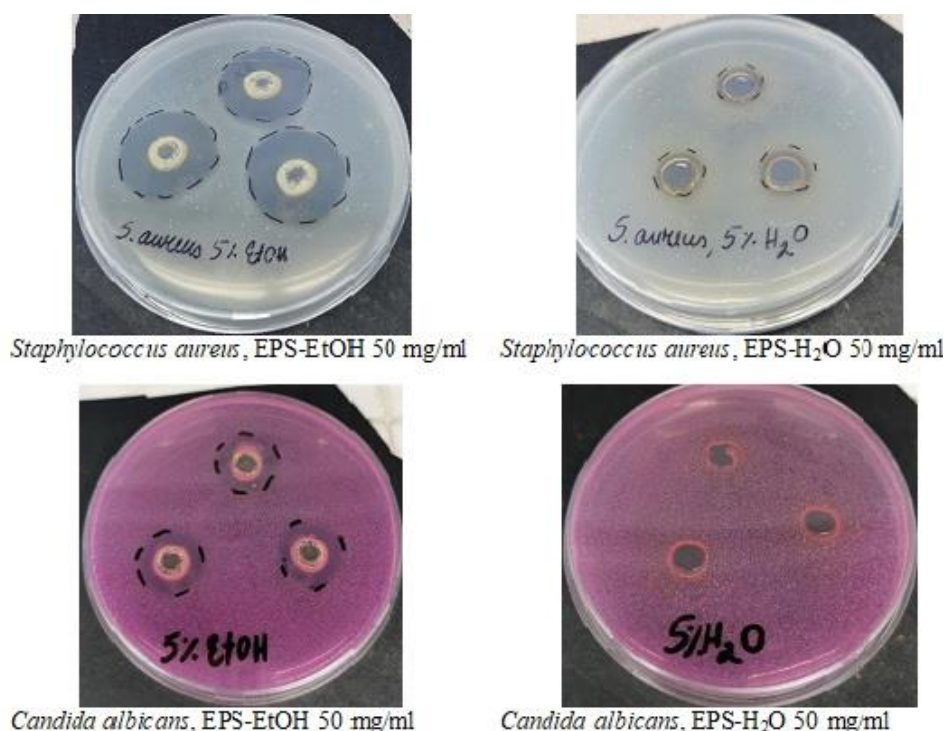
Gauti rezultatai rodo (6 ir 7 lentelės), jog siekiant išgauti kuo didesnę polinių junginių kiekį iš balzaminių tuopų pumpurų, tikslinga taikyti žaliavos pakopinę EPS skirtingo poliškumo tirpikliais. Nustatytais optimaliomis sąlygomis dviejų pakopų EPS iš *P. balsamifera* pumpurų galima išskirti iš viso 60,3 g/100 g polinių komponentų: 88 % šio kiekio gaunami ekstrahuojant pumpurus etanoliu (78 °C, 18 min), likę 22 % – apdorojant liekaną po EPS-EtOH subkizininiu vandeniu (110 °C, 15 min). BFJK iš viso išgaunama 87,1 mg GRE/g TP (92 % ekstrahuojant etanoliu), TEAG<sub>ORAC</sub> – 1531,0 mg TE/g TP (net 95 % ekstrahuojant etanoliu), TEAG<sub>ABTS</sub> – 569,5 mg TE/g TP (93 % ekstrahuojant *P. balsamifera* pumpurus etanoliu). Optimaliomis EPS sąlygomis iš *P. balsamifera* pumpurų iš viso galima išskirti 27,47 mg/g TP pinocebrino, net 99 % ekstrahuojant pumpurus etanoliu, pinostrobino – 7,0 mg/g TP; visas šis kiekis išgaunamas pirmojo etapo metu atliekant EPS-EtOH.

### **3.4. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų antimikrobinio aktyvumo nustatymas**

Optimaliomis sąlygomis gautų *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) bei EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) ekstraktų antimikrobinis aktyvumas buvo ištirtas naudojant keturias mikroorganizmų rūšis: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* NCTC 12900 ir *Candida albicans* ATCC 90028. Gauti rezultatai pateikti 8 lentelėje ir 20 paveiksle.

Tyrimams pasirinkti mikroorganizmų tipai yra susiję su įvairiomis odos ir gleivinių infekcijomis. Pavyzdžiui gramteigiamos *Staphylococcus aureus* bakterijos gali sukelti infekcijas, pradedant paviršine oda ir lokalizuotais abscesais, iki ypač sunkių infekcijų, tokių kaip osteomielitas, endokarditas, impetigo, ar kitas infekcines odos ligas [122, 123]. Spuogų ir aknės atsiradimą lemia *C. acnes* bakterijų kolonizacija ir uždegiminė reakcija, kurią sukelia *S. aureus* bakterijos [124]. Gramneigiamos *Escherichia coli* yra fiziologinė žarnyno floros dalis, tačiau už žarnyno ribų ši

padermė gali sukelti žaizdų infekcijas ir sepsį [122]. Asmenims, turintiems sveiką imuninę sistemą, *Candida albicans* mielės dažnai yra nekenksmingos, tačiau dėl įvairių pokyčių gali kilti infekcijos, kurios pasireiškia nuo paviršinių gleivinių ir odos infekcijų, tokių kaip pienligė, makšties mielių infekcijos, iki hematogeniškai išplitusios infekcijos [123].



20 pav. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų antimikrobinis aktyvumas

8 lentelė. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų antimikrobinis aktyvumas

Mikroorganizmų tipas	Gramteigiamos bakterijos	Gramneigiamos bakterijos		Mielės
Mikroorganizmų rūšis	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATTC 8739	<i>Escherichia coli</i> NTC 12900	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
Sterilios zonos diametras, mm				
EPS-EtOH 10 mg/ml	21,11±0,19 <sup>b</sup>	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>	15,56±0,38 <sup>a</sup>
EPS-EtOH 25 mg/ml	23,44±0,19 <sup>c</sup>	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>	15,89±0,19 <sup>a</sup>
EPS-EtOH 50 mg/ml	25,00±0,58 <sup>d</sup>	11,67±0,33	– <sup>n</sup>	16,78±0,38 <sup>b</sup>
EPS-H <sub>2</sub> O 10 mg/ml	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>
EPS-H <sub>2</sub> O 25 mg/ml	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>
EPS-H <sub>2</sub> O 50 mg/ml	11,56±0,51 <sup>a</sup>	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>	– <sup>n</sup>

–<sup>n</sup> – nenustatyta; EPS – ekstrakcija padidintame slėgyje; Skirtingos viršutinio indekso raidės žymi reikšmingus skirtumus tarp verčių stulpelyje (vienfaktorinė dispersinė analizė ANOVA ir Tukey testas,  $p < 0,05$ ).

Gauti rezultatai, kurie pateikti 8 lentelėje rodo, jog balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH ekstraktas pasižymi antimikrobinio aktyvumu prieš gramteigiamas *Staphylococcus aureus* bakterijas (sterilios zonos diametras 21,1–25,0 mm) ir *Candida albicans* mieles (15,6–16,8 mm). Matoma, jog užtenka mažiausios naudotos (10 mg/ml) ekstrakto koncentracijos antimikrobiniam aktyvumui pasireikšti, o didinant ekstrakto koncentraciją iki 50 mg/ml, sterilios zonos diametras statistiškai reikšmingai padidėja tik 1,2–3,9 mm. Gramneigiamų *Escherichia coli* ATTC 8739 bakterijų augimą inhibuoja tik

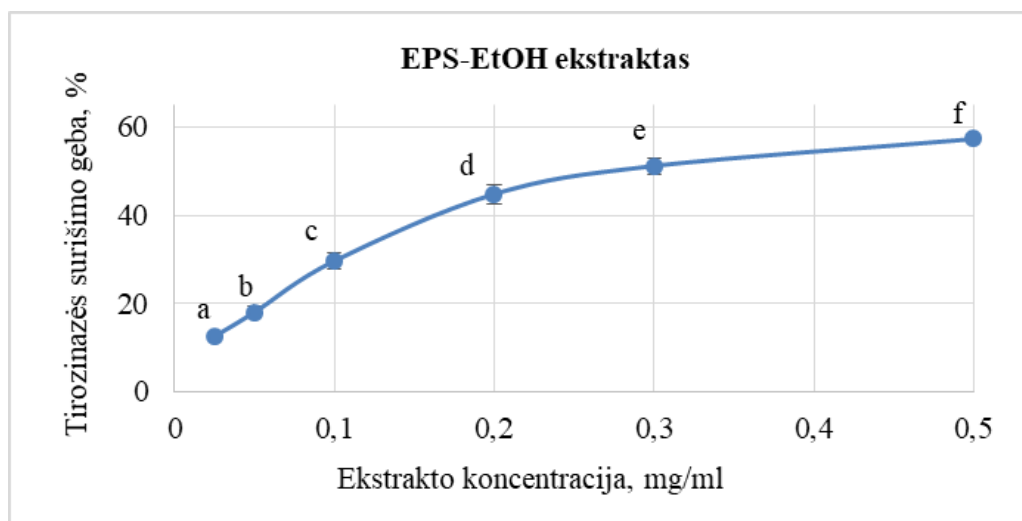
aukštesnės koncentracijos (50 mg/ml) EPS-EtOH ekstraktas. EPS-H<sub>2</sub>O šios koncentracijos ekstraktas slopina tik gramteigiamų *Staphylococcus aureus* bakterijų augimą (11,6 mm), tačiau efektyvumas yra dvigubai mažesnis nei EPS-EtOH ekstrakto. Išanalizavus 8 lentelėje gautus duomenis paaiškėjo, kad balzaminių tuopų pumpurų ekstraktai buvo veiksmingesni prieš gramteigiamas bakterijas ir mieles lyginant su gramneigiamomis bakterijomis. Balzaminių tuopų pumpurų ekstraktuose randamas platus veikliųjų junginių spektras (flavonoidai, fenolinės rūgštys ir balzakonai), kuris gali būti siejamas su antibakteriniu ekstrakto aktyvumu [6, 75]. Gramteigiamos bakterijos yra jautresnės ir mažiau apsaugotos nuo polifenolinių junginių poveikio, nes jas gaubia išorinis porėtas peptidoglikanų sluoksnis, kuris gali užkirsti difuzijos kelią tik molekulėms, kurių molinė masė didesnė kaip 50 000 D. Gramneigiamos bakterijos atsparesnės, nes jos turi papildomą tankų išorinį membranos ir ploną peptidoglikano sluoksnį [125].

Anksčiau publikuoti mokslinių tyrimų rezultatai taip pat patvirtina hipotezę, kad gramteigiamos bakterijos ir mielės yra jautresnės tuopų pumpurų ekstraktams nei gramneigiamos bakterijos. Pavyzdžiui, skirtingų tuopų rūšių (*P. nigra*, *P. alba*, *P. tremula*) pumpurų metanoliniai ekstraktai, išgauti maceracijos būdu, pasižymėjo plačiu antibakterinio aktyvumo spektru. Jautriausios šiems ekstraktams buvo gramteigiamos bakterijos, tokios kaip *Staphylococcus aureus* (MSK (mažiausia slopinamoji koncentracija) 0,25–0,5 mg/ml), *Streptococcus pyogenes* (MSK 0,5–1,0 mg/ml) ir *Enterococcus faecium* (MSK 0,5–1,0 mg/ml). Ekstraktai pasižymėjo ir aktyvumu prieš *Candida albicans* mieles (MSK 0,5–1,0 mg/ml), tačiau gramneigiamų bakterijų taip pat neveikė, kaip ir šiuose tyrimuose naudoti *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O bandiniai [15]. Benedec ir kt. tyrė maceracijos būdu pagamintos juodųjų tuopų pumpurų (*P. nigra*) tinktūros antibakterines savybes. Nustatyta, kad 25 mg/ml koncentracijos tinktura silpnai veikia gramteigiamas *Staphylococcus aureus* (sterilios zonos diametras 13 mm) ir *Listeria monocytogenes* (15 mm) bakterijas, tačiau neturi poveikio gramneigiamų bakterijų *Escherichia coli* ir *Salmonella typhimurium* augimui [76]. Nassima ir kt. ištyrė baltųjų tuopų (*P. alba*) pumpurų antibakterinį aktyvumą ir nustatė, kad maceruojant pumpurus su etanoliu gaunamas ekstraktas efektyviau, kaip ir šiuose tyrimuose naudotas *P. balsamifera* EPS-EtOH ekstraktas, slopina gramteigiamų *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, meticilinui atsparių *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, ir *Listeria innocua* Clip 74915 bakterijų augimą (sterilios zonos diametras 11–13 mm, kai koncentracija yra 20 mg/ml) nei gramneigiamų *Escherichia coli* ATCC 9029, *Escherichia coli* ATCC 25922 ir *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bakterijų (sterilios zonos diametras 8–9 mm) [6]. Taip pat literatūroje rasta duomenų, susijusių su juodųjų tuopų (*P. nigra*) pumpurų vandeninio ekstrakto, išgauto maceracijos metodu, antibakterinėmis savybėmis. Nustatyta, kad 185 mg/ml koncentracijos ekstraktas slopina mielių *Candida albicans* augimą (sterilios zonos diametras 26–43 mm) [104]. Vandeninė baltųjų tuopų pumpurų frakcija pasižymi antibakteriniu aktyvumu prieš gramteigiamų *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, meticilinui atsparių *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, ir *Listeria innocua* Clip 74915 bakterijų (sterilios zonos diametras 8–12 mm, kai koncentracija yra 20 mg/ml) augimą, šiek tiek silpniau veikia *Bacillus subtilis* ATCC 6633 gramteigiamų ir gramneigiamų *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų augimą (sterilios zonos diametras 7 mm). Kaip ir šiuose tyrimuose naudotas *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktas, vandeninis baltųjų tuopų (*P. alba*) pumpurų ekstraktas (20 mg/ml) neinhibuoja *Candida albicans* ir *Saccharomyces cerevisiae* mielių augimo [6].

### 3.5. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų tirozinazės inhibicijos gebos nustatymas

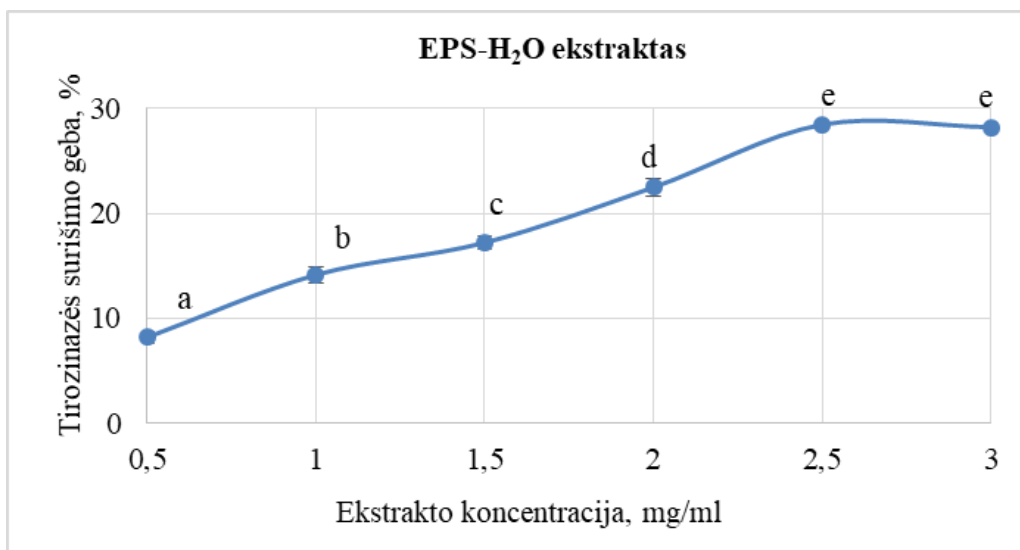
Fermentas tirozinazė atlieka svarbų vaidmenį melanino sintezėje ir lemia plaukų, odos bei akių pigmentaciją. Šis vario turintis fermentas katalizuoja pirmąsias dvi melanino sintezės reakcijas: L-tirozino hidroksilinimą iki 3,4-dihidroksifenilalanino (L-DOPA) ir L-DOPA oksidavimą iki dopakvinono. Padidėjęs tirozinazės aktyvumas sukelia odos sutrikimus, pavyzdžiui, pigmentinę dilgėlinę, strazdanas ar su amžiumi susijusią odos hiperpigmentaciją. Tirozinazės inhibitoriai, tokie kaip hidrochinonas, kojo rūgštis, arbutinas, azelaino rūgštis, retinoidai, kortikosteroidai bei vitaminas C, dažniausiai naudojami įvairių odą šviesinančių kosmetikos preparatų sudėtyje. Šios veikliosios medžiagos stabdo tirozino vartimą melaninu, be to, pasižymi antioksidacinėmis ir priešuždegiminėmis savybėmis [126]. Daugelis tirozinazės inhibitorių sukelia šalutinius poveikius (pavyzdžiui, alergija, niežėjimas, patinimas) arba yra nepakankamai veiksmingi ar toksiški, todėl nuolat ieškoma natūralių tirozinazės šaltinių ir tikimasi, kad jie neturi žalingo šalutinio poveikio [127]. Maack ir Pegard'o atlikto tyrimo rezultatai parodė, kad juodųjų tuopų pumpurams būdingos tirozinazės inhibicinės savybės [4]. Atsižvelgiant į tai, šiame tyrime buvo įvertinta balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ir EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) ekstraktų tirozinazės inhibicijos geba.

Remiantis 21 ir 22 paveiksluose pateiktais grafikai matoma, kad EPS-EtOH balzaminių tuopų pumpurų ekstraktas efektyviau slopina tirozinazės veiklą, lyginant su EPS-H<sub>2</sub>O. EPS-EtOH 0,3 mg/ml koncentracijos ekstraktas inhibuoja 51,2 % tirozinazės fermento. Didinant ekstrakto koncentraciją iki 0,5 mg/ml, inhibicija padidėja iki 57,3 %. EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktas inhibuoja 27,6–28,4 % tirozinazės fermento, esant 2,5–3,0 mg/ml koncentracijai. Grafikuose matoma, kad tirozinazės slopinimo geba nėra tiesiškai priklausoma nuo ekstrakto koncentracijos: didinant EPS-EtOH ekstrakto koncentraciją nuo 0,2 mg/ml iki 0,5 mg/ml inhibicijos geba padidėja nuo 44,8 % iki 57,3 %. EPS-EtOH ekstrakto tirozinazės inhibicijos geba, išreikšta kojo rūgšties ekvivalentais, siekia 108,2 mg KRE/g TP (202,3 mg KRE/g E), o EPS-H<sub>2</sub>O ekstrakto aktyvumas yra žymiai mažesnis ir siekia 0,4 mg KRE/g TP (5,2 mg KRE/g E).



Skirtingos viršutinio indekso raidės žymi reikšmingus skirtumus tarp verčių eilutėje (vienfaktorinė dispersinė analizė ANOVA ir Tukey testas,  $p < 0,05$ )

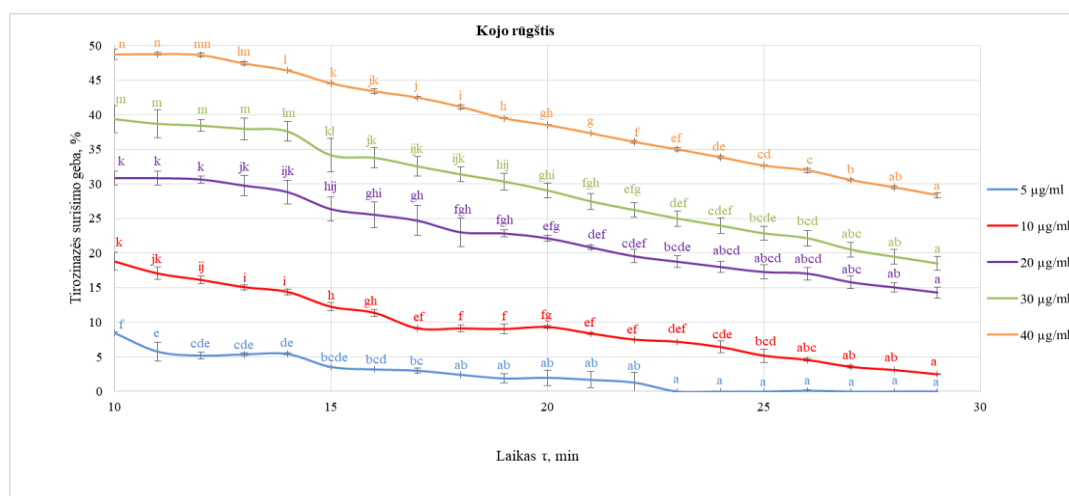
**21 pav.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstrakto tirozinazės inhibicijos geba



Skirtingos viršutinio indekso raidės žymi reikšmingus skirtumus tarp verčių eilutėje (vienfaktorinė dispersinė analizė ANOVA ir Tukey testas,  $p < 0,05$ )

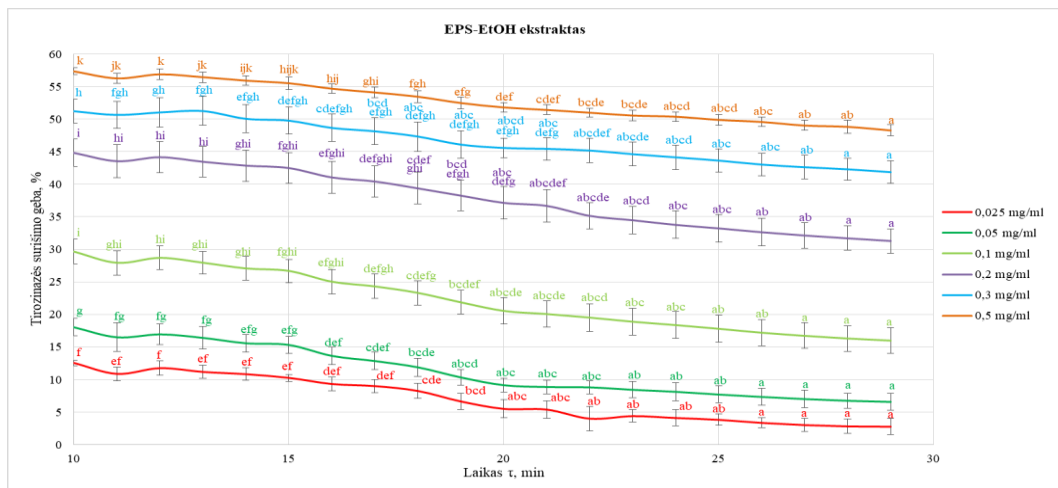
**22 pav.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) ekstrakto tirozinazės inhibicijos geba

Fermentų inhibitoriai skirstomi į dvi pagrindines grupes, t.y., grįžtamuosius ir negrįžtamuosius inhibitorius, atsižvelgiant į tai, ar yra sukeliama negrįžtama fermento inaktyvacija. Padidėjus grįžtamojo inhibitoriaus koncentracijai, fermento aktyvumas sumažėja, tačiau inhibitorius tik slopina fermento aktyvumą, o ne visam laikui inaktyvina fermentą. Kai inhibitoriaus koncentracija sumažėja, tirozinazės aktyvumas vėl padidėja [128]. Stebint balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų bei kojo rūgšties tirozinazės inhibicijos gebos priklausomybę nuo laiko, nustatyta, kad šie inhibitoriai veikia kaip grįžtamieji (23–25 pav.). Remiantis 23–25 paveiksluose pateiktais grafikai matoma, kad balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH ekstraktas yra stabiliausias. Per 20 min, po inkubacijos, EPS-EtOH ekstrakto tirozinazės inhibicija sumažėja nuo 15 % (0,5 mg/ml) iki 75 % (0,025 mg/ml), EPS-H<sub>2</sub>O ekstrakto – nuo 30 % (2,5 mg/ml) iki 70 % (1,5 mg/ml), o naudojant mažiausią koncentraciją (0,5 mg/ml), po 9 min ekstraktas nebeslopina tirozinazės. Tuo tarpu kojo rūgšties efektyvumas per šį laiką sumažėja net nuo 40 % (40 μg/ml) iki 90 % (10 μg/ml), o naudojant 5 μg/ml koncentraciją, po 14 min rūgštis nebeslopina tirozinazės.



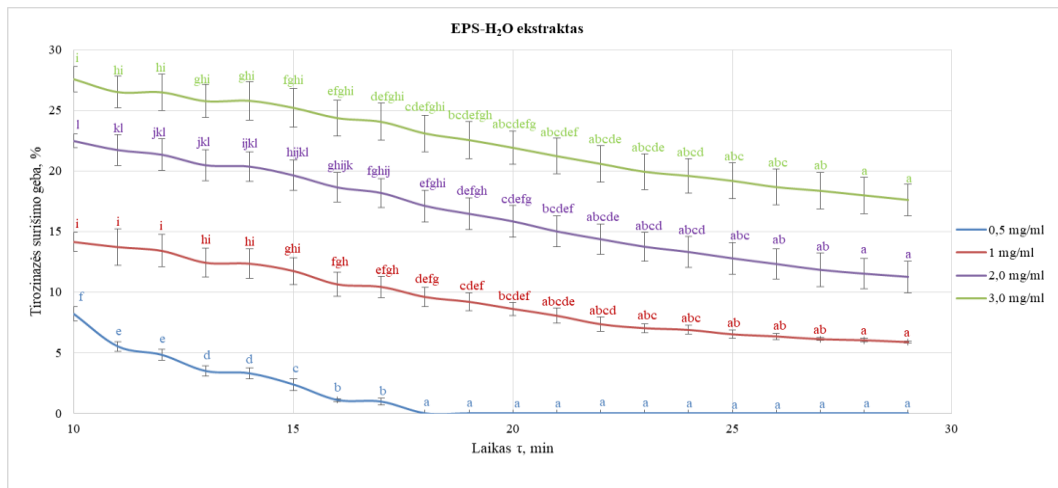
Laikas  $\tau$  (min) pateiktas po 9 min inkubacijos; Skirtingos viršutinio indekso raidės žymi reikšmingus skirtumus tarp verčių eilutėje (vienfaktorinė dispersinė analizė ANOVA ir Tukey testas,  $p < 0,05$ )

**23 pav.** Kajo rūgšties tirozinazės inhibicijos gebos priklausomybė nuo laiko



Laikas  $\tau$  (min) pateiktas po 9 min inkubacijos; Skirtingos viršutinio indekso raidės žymi reikšmingus skirtumus tarp verčių eilutėje (vienfaktorinė dispersinė analizė ANOVA ir Tukey testas,  $p < 0,05$ )

**24 pav.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstrakto tirozinazės inhibicijos gebos priklausomybė nuo laiko



Laikas  $\tau$  (min) pateiktas po 9 min inkubacijos; Skirtingos viršutinio indekso raidės žymi reikšmingus skirtumus tarp verčių eilutėje (vienfaktorinė dispersinė analizė ANOVA ir Tukey testas,  $p < 0,05$ )

**25 pav.** *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) ekstrakto tirozinazės inhibicijos gebos priklausomybė nuo laiko

Literatūros duomenimis teigiama, jog antioksidacinės tuopų pumpurų savybės padidina depigmentacijos potencialą, o daugelis tirozinazės inhibitorių, kaip ir balzaminių tuopų pumpurai, pasižymi antibakteriniu poveikiu [4, 129]. Maack ir Pegard ištyrė juodųjų tuopų pumpurų absoliutą ir palygino su etaloniniu tirozinazės inhibitoriumi – kojo rūgštimi. Nustatyta, kad tuopų pumpurų absoliutas yra stiprus *Agaricus bisporus* tirozinazės inhibitorius, kurio  $IC_{50} = 0,1$  mg/g [4]. Daugelio junginių (pavyzdžiui, hidrochinonas, kojo rūgštis, azelaino rūgštis, kortikosteroidai, retinoidai, arbutinas), kurie slopina tirozinazės fermentinį aktyvumą, naudojimas kosmetikos pramonėje yra prieštaringai vertinamas, kadangi šios veikliosios medžiagos gali pakenkti odos būklei. Pavyzdžiui kojo rūgštis kai kuriems žmonėms, ypač turintiems jautrią odą, gali sukelti kontaktinį alerginį dermatitą, pasireiškiantį bėrimu, patinimu, niežėjimu ir pūslelėmis [4]. Šio tyrimo metu nustatyta, kad balzaminių tuopų pumpurų EPS-EtOH ekstraktas, išgautas optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis, efektyviai slopina tirozinazę ir gali tapti alternatyva kojo rūgščiai, kuri naudojama kosmetikos preparatuose odos pigmentacijai mažinti.

## Išvados

1. EPS-EtOH optimizavimo rezultatai rodo, kad:
  - 1.1 Visi nepriklausomų kintamųjų modeliai buvo statistiškai reikšmingi su šiomis Fišerio kriterijaus reikšmėmis: ekstraktų išeiga – 178,7, BFJK – 43,8, TEAG<sub>ORAC</sub> – 134,7, BKK – 93,4, chlorofilo a kiekis – 453,0, chlorofilo b kiekis – 366,3, BCK – 340,3, pinocembrino kiekis – 26,85, o pinostrobinas – 19,9. Nustatyta, kad ~80 % ekstrakto išeigos priklausė nuo temperatūros poveikio. BFJK temperatūra lėmė ~57 %, o parametrai T ir T<sup>2</sup> kartu lėmė net ~75 % TEAG<sub>ORAC</sub>. BKK priklausė ne tik nuo temperatūros poveikio, bet ir nuo laiko kvadratinės sąveikos (T ir τ<sup>2</sup>), abu šie parametrai lėmė net ~85 % BKK. Chlorofilo a ir b kiekis bei BCK taip pat daugiausia priklausė nuo temperatūros pokyčio (~78 %, ~74 % ir ~81 %, atitinkamai). Tikslinių fenolinių junginių kiekiui ekstrakcijos laikas ir temperatūra turėjo didžiausią įtaką, abu šie veiksniai lėmė ~67 % išgauto pinocembrino kiekio, o pinostrobinas – ~65 %.
  - 1.2 Vykdamas *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH 78 °C temperatūroje 18 min, galima išgauti didžiausią bendrą ekstrakto (53,5 g/100 g TP), *in vitro* antioksidacinę gebą pasižyminčių junginių (BFJK – 79,7 mg GRE/g TP, TEAG<sub>ORAC</sub> – 1459,9 mg TE/g TP, TEAG<sub>ABTS</sub> – 530,9 mg TE/g TP) ir tikslinių fenolinių junginių kiekį (pinocembrino – 27,3 mg/g TP, pinostrobinas – 7,0 mg/g TP). Optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis buvo pasiekta didžiausia karotinoidų išeiga (107,4 μg/g TP) bei sumažintas nepageidaujama žalia spalva ekstraktams suteikiančių chlorofilų kiekis.
2. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto (78 °C, 18 min) viršerdvėje buvo nustatyti 154 lakieji junginiai. Pagrindinė lakiųjų junginių dalis priklausė angliavandeniliniams seskviterpenams, kurie sudarė net 83,2 %. Angliavandeniliniai seskviterpenai α-murolenas (8,6 %), γ-kurkumenas (7,3 %), β-kurkumenas (4,4 %) ir trans-α-bergamotenas (3,6 %) buvo pagrindiniai identifikuoti lakieji junginiai *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto viršerdvėje, kurie suteikė ekstraktui balzamo, žolelių, prieskonių bei medienos aromatą.
3. Vykdamas *P. balsamifera* pumpurų EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) papildomai buvo išskirta 6,9 g/100 g TP polinių komponentų. BFJK buvo 7,3 mg TE/g TP, *in vitro* antioksidacinis aktyvumas TEAG<sub>ORAC</sub> siekė 71,2 mg TE/g TP, o TEAG<sub>ABTS</sub> – 38,5 mg TE/g TP. *P. balsamifera* pumpurų liekanoje nustatyta 0,2 mg/g TP pinocembrino, o pinostrobinas neaptikta.
4. Nustatytomis optimaliomis sąlygomis dviejų pakopų EPS iš *P. balsamifera* pumpurų iš viso buvo išskirta 60,3 g/100 g TP polinių komponentų, o BFJK – 87,1 mg GRE/g TP, TEAG<sub>ORAC</sub> – 1531,0 mg TE/g TP, TEAG<sub>ABTS</sub> – 569,5 mg TE/g TP. Optimaliomis EPS sąlygomis iš viso buvo išgauta 27,47 mg/g TP pinocembrino, o pinostrobinas – 7,0 mg/g TP; visas pinostrobinas kiekis išgaunamas pirmojo etapo metu atliekant EPS-EtOH (78 °C, 18 min).
5. *P. balsamifera* EPS-EtOH ekstraktas (78 °C, 18 min) pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu prieš gramteigiamas *Staphylococcus aureus* bakterijas (sterilios zonos diametras 21,1–25,0 mm) bei slopino *Candida albicans* mielių (sterilios zonos diametras 15,6–16,8 mm) augimą, o EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) ekstraktas buvo efektyvus tik prieš *Staphylococcus aureus* gramteigiamas bakterijas (sterilios zonos diametras 11,6 mm), esant 50 mg/ml ekstrakto koncentracijai.
6. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstrakto tirozinazės inhibicijos geba buvo 202,3 mg KRE/g E, atitinkamai 108,2 mg KRE/g TP, o EPS-H<sub>2</sub>O (110 °C, 15 min) – 5,2 mg KRE/g E, atitinkamai 0,4 mg KRE/g TP. Lyginant kojo rūgštis, EPS-EtOH ir EPS-H<sub>2</sub>O ekstraktų tirozinazės inhibicijos gebos priklausomybę nuo laiko, nustatyta, kad *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH (78 °C, 18 min) ekstraktas buvo stabiliausias ir efektyviausiai išlaikė surištą tirozinazės fermentą.

## Literatūros sąrašas

1. HARHAUN, R., et al. Biologically active properties of plant extracts in cosmetic emulsions. *Microchemical Journal* [interaktyvus]. 2020, 154, 104543 [žiūrėta 2021-05-03]. Prieiga per: doi:10.1016/j.microc.2019.104543.
2. TAWFEEK, N., et al. Phenolic compounds from *Populus alba* L. and *Salix subserata* Willd. (Salicaceae) Counteract Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* [interaktyvus]. 2019, 24 [žiūrėta 2021-05-03]. Prieiga per: doi:10.3390/molecules24101999\_rfseq1.
3. KUS, P. M., et al. Development of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive phytochemicals from black poplar (*Populus nigra* L.) buds followed by GC–MS and UHPLC-DAD-QqTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [interaktyvus]. 2018, 158, 15–27 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jpba.2018.05.041.
4. MAACK, A. ir A., PEGARD. *Populus nigra* (Salicaceae) absolute rich in phenolic acids, phenylpropanoids and flavonoids as a new potent tyrosinase inhibitor. *Fitoterapia* [interaktyvus]. 2016, 111, 95–101 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per: doi:10.1016/j.fitote.2016.04.001.
5. LAVOIE, S., et al. New antibacterial dihydrochalcone derivatives from buds of *Populus balsamifera*. *Tetrahedron Letters* [interaktyvus]. 2013, 54(13), 1631–1633 [žiūrėta 2021-01-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.tetlet.2012.12.012.
6. NASSIMA, B., et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic compounds extracted from *Populus nigra* and *populus alba* buds (Algeria). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2019, 55 [žiūrėta 2020-04-23]. Prieiga per: doi:10.1590/s2175-97902019000218114.
7. PEARSON, C. H., et al. Natural rubber quantification in sunflower using an automated solvent extractor. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2010, 31, 469–475 [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.indcrop.2010.01.006.
8. KUS, P., et al. Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO<sub>2</sub> and its optimization by response surface methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [interaktyvus]. 2018, 152, 128–136 [žiūrėta 2021-02-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jpba.2018.01.046.
9. BAS, D. ir I. H. BOYACI. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. 2007, 78(3), 836–845 [žiūrėta 2021-03-01]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.
10. RICHARDSON, J. *Poplars and Willows. Trees for Society and the Environment*, 2014. ISBN 9781780641089.
11. Dapkūnienė, S., et al. Augalų nacionaliniai genetiniai išteklių Lietuvos parkuose ir sodybose. *Lietuvos Respublikos aplinkos ministerija, Augalų genų bankas, Vilniaus universiteto botanikos sodas*. 2015. ISBN 978-609-8126-32-7.
12. GOUGHERTY, A. V., et al. Contemporary range position predicts the range-wide pattern of genetic diversity in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). *Journal of Biogeography* [interaktyvus]. 2020, 1–12 [žiūrėta 2020-04-20]. Prieiga per: doi:10.1111/jbi.13811.
13. DEVAPPA, R. K., et al. Forest biorefinery: Potential of poplar phytochemicals as value-added co-products. *Biotechnology Advances* [interaktyvus]. 2015, 33(6), 681–716 [žiūrėta 2021-05-16]. Prieiga per: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.012.
14. The PLANTS Database. USDA, NRCS [interaktyvus]. 2006 [žiūrėta 2020-03-25]. Prieiga per: <http://plants.usda.gov>.
15. VARDAR-UNLU, G., et al. Composition and in vitro antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. 2008, 24(7), 1011–1017 [žiūrėta 2021-04-16]. Prieiga per: doi:10.1007/s11274-007-9566-5.
16. ANDELKOVIC, B., et al. Metabolomics study of *Populus* type propolis. *Journal of Pharmaceutical and*

- Biomedical Analysis* [interaktyvus]. 2017, 135, 217–226 [žiūrėta 2021-05-22]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jpba.2016.12.003.
17. OKINCZYC, P. et al. Profile of polyphenolic and essential oil composition of polish propolis, black poplar and aspens buds. *Molecules* [interaktyvus]. 2018, 23(6), 1–18 [žiūrėta 2020-11-13]. Prieiga per: doi: 10.3390/molecules23061262.
  18. MEDICINE TRADITIONS [žiūrėta 2021-05-10]. Prieiga per: <https://www.medicinetraditions.com/populus-poplar-tree.html>.
  19. JERKOVIĆ, I. ir J. MASTELIĆ. Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae). *Phytochemistry* [interaktyvus]. 2003, 63(1), 109–113 [žiūrėta 2020-05-14]. Prieiga per: doi:10.1016/S0031-9422(02)00706-9.
  20. ISAEVA, E. V., et al. A Study of the Alcohol Extract from Balsam Poplar Buds. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* [interaktyvus]. 2010, 36(7), 929–933 [žiūrėta 2021-02-27]. Prieiga per: doi:10.1134/S1068162010070228.
  21. ISIDOROV, V. A. ir V. T. VINOGOROVA. GC-MS analysis of compounds extracted from buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra*. *Journal of Biosciences* [interaktyvus]. 2003, 58(5–6), 355–360 [žiūrėta 2021-02-27] Prieiga per: doi:10.1515/znc-2003-5-612.
  22. AWOUAFACK, M. D., et al. Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry* [interaktyvus]. 2013, 33–103 [žiūrėta 2021-02-27]. ISBN 9780124059276. Prieiga per: 10.1016/B978-0-12-405927-6.00002-3.
  23. DUDONNE, S., et al. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Poplar Bud (*Populus nigra*) Extract: Individual Antioxidant Contribution of Phenolics and Transcriptional Effect on Skin Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2011, 59(9), 4527–4536 [žiūrėta 2021-02-08]. Prieiga per: doi:10.1021/jf104791t.
  24. TAOFIQ, O., et al. Phenolic acids, cinnamic acid, and ergosterol as cosmeceutical ingredients: Stabilization by microencapsulation to ensure sustained bioactivity. *Microchemical Journal* [interaktyvus]. 2019, 147, 469–477 [žiūrėta 2021-02-20]. Prieiga per: doi:10.1016/j.microc.2019.03.059.
  25. POBLOCKA-OLECH, L., et al. Anti-inflammatory and antioxidative effects of the buds from different species of *Populus* in human gingival fibroblast cells: Role of bioflavonones. *Phytomedicine* [interaktyvus]. 2019, 56, 1–9 [žiūrėta 2021-02-20]. Prieiga per: doi:10.1016/j.phymed.2018.08.015.
  26. SHARMA, A., et al. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* [interaktyvus]. 2019, 24(13), 1–22 [žiūrėta 2020-04-25]. Prieiga per: doi:10.3390/molecules24132452.
  27. CHEYNIER, V., et al. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* [interaktyvus]. 2013, 72, 1–20 [žiūrėta 2020-04-25]. Prieiga per: doi:10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
  28. LI, A. N., et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* [interaktyvus]. 2014, 6(12), 6020–6047 [žiūrėta 2020-04-25]. Prieiga per: doi:10.3390/nu6126020.
  29. TYSKIEWICZ, K., et al. Characterization of bioactive compounds in the biomass of black locust, poplar and willow. *Trees - Structure and Function* [interaktyvus]. 2019, 33(5), 1235–1263 [žiūrėta 2020-04-26]. Prieiga per: doi:10.1007/s00468-019-01837-2.
  30. NAIKOO, M. I., et al. Role and Regulation of Plants Phenolics in Abiotic Stress Tolerance. *Plant Signaling Molecules*. 2019, 157–168. ISBN 9780128164518
  31. BHATTACHARYA, A., et al. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology* [interaktyvus]. 2010, 11(5), 705–719 [žiūrėta 2020-04-26]. Prieiga per: doi:10.1111/J.1364-3703.2010.00625.X.
  32. ISIDOROV, V. A., et al. Rapid gc/ms determination of botanical precursors of eurasian propolis. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, 142, 101–106 [žiūrėta 2021-05-19]. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.032.

33. SAYRE, C., et al. Pre-clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of selected chiral flavonoids: Pinocembrin and pinostrobin. *J. Pharm. Pharm. Sci* [interaktyvus]. 2015, 18(4), 368–396 [žiūrėta 2020-11-03]. Prieiga per: doi:10.18433/j3bk5t.
34. BONETTI, F., et al. Nootropics, Functional Foods, and Dietary Patterns for Prevention of Cognitive Decline. *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*. 2017, 211–232 [žiūrėta 2021-05-22]. Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-805376-8.00019-8.
35. BAČENSKAITĖ, L. ir V. ALEKNAVIČIŪTĖ. Asmenų, patyrusių galvos smegenų insultą, liemens kontrolės lavinimo įtaka rankos sąnarių judesių amplitudei bei funkciniam judesiui. *Profesinės Studijos: teorija. ir praktika*. 2014, 13, 8–13. ISSN 2345-0576
36. Clinical Trials. [žiūrėta 2020-11-03]. Prieiga per: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02059785>.
37. SHEN, X., et al. Advances in biosynthesis, pharmacology, and pharmacokinetics of pinocembrin, a promising natural small-molecule drug. *Molecules* [interaktyvus]. 2019, 24(12) [žiūrėta 2020-11-03]. Prieiga per: doi:10.3390/molecules24122323.
38. WU, N., et al. Activity investigation of pinostrobin towards herpes simplex virus-1 as determined by atomic force microscopy. *Phytomedicine* [interaktyvus]. 2011, 18(2–3), 110–118 [žiūrėta 2020-11-05]. Prieiga per: doi:10.1016/j.phymed.2010.07.001.
39. BAIL, J. C. L., et al. Effects of pinostrobin on estrogen metabolism and estrogen receptor transactivation. *Cancer Letters* [interaktyvus]. 2000, 156(1), 37–44 [žiūrėta 2020-11-03]. Prieiga per: doi:10.1016/s0304-3835(00)00435-3.
40. BANG, H. J. ir M. R. AHN. Antiangiogenic effect of pinobanksin on human umbilical vein endothelial cells. *Journal Functional Foods* [interaktyvus]. 2021, 79 [žiūrėta 2021-05-23]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jff.2021.104408.
41. PANCHE, A. N., et al. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science* [interaktyvus]. 2016, 5(47), 1–15 [žiūrėta 2020-04-11]. Prieiga per: doi:10.1017/jns.2016.41.
42. JIANG, R.-W., et al. Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Current Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2012, 12(2), 237–246 [žiūrėta 2020-04-11]. Prieiga per: doi:10.2174/0929867053363397.
43. KIM, J. K. ir S. U. PARK. A recent overview on the biological and pharmacological activities of ferulic acid. *EXCLI Journal* [interaktyvus]. 2019, 18, 132–138 [žiūrėta 2020-04-11]. Prieiga per: doi:10.17179/excli2019-1138.
44. CIZMAROVA, B., et al. Caffeic acid: a brief overview of its presence, metabolism, and bioactivity. *Bioactive Compounds in Health and Disease* [interaktyvus]. 2020, 3(4), 74–81 [žiūrėta 2021-05-23]. Prieiga per: doi:10.31989/bchd.v3i4.692.
45. ZDUNSKA, K., et al. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacology and Physiology* [interaktyvus]. 2018, 31(6), 332–336 [žiūrėta 2020-11-03]. Prieiga per: 10.1159/000491755.
46. SAIJA, A., et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics* [interaktyvus]. 2000, 199(1), 39–47 [žiūrėta 2020-11-06]. Prieiga per: doi:10.1016/S0378-5173(00)00358-6.
47. X. Mao, Q. Yang, D. Chen, B. Yu, and J. He, “Benzoic acid used as food and feed additives can regulate gut functions,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/5721585.
48. KILIC, I. ir Y. YESILOGLU. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* [interaktyvus]. 2013, 115, 719–724 [žiūrėta 2021-05-23]. Prieiga per: doi:10.1016/j.saa.2013.06.110.
49. SIMARD, F., et al. Antibacterial Balsacones J-M, Hydroxycinnamoylated Dihydrochalcones from *Populus balsamifera* Buds. *Journal of Natural Products* [interaktyvus]. 2015, 78(5), 1147–1153 [žiūrėta 2021-05-23]. Prieiga per: doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00155.

50. SIMARD, F., et al. Structure elucidation of anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) flavonoids from balsam poplar buds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2016, 24(18), 4188–4198 [žiūrėta 2021-01-23]. Prieiga per: doi:10.1016/j.bmc.2016.07.009.
51. BELANGER, A., et al. Dihydrochalcone derivatives from *populus balsamifera* l. Buds for the treatment of psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2020, 21(1), 1–15 [žiūrėta 2021-01-23]. Prieiga per: doi:10.3390/ijms21010256.
52. NESTLE, P. O., et al. Mechanisms of Disease Psoriasis. *The New England Journal of Medicine* [interaktyvus]. 2009, 361, 496–509 [žiūrėta 2021-01-20]. Prieiga per: doi: 10.1056/NEJMra0804595.
53. BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2005, 2(1), 29–32 [žiūrėta 2021-02-15]. Prieiga per: doi:10.1093/ecam/neh059.
54. DEBBACHE, N., et al. Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Industrial Crops and Products* [interaktyvus]. 2014, 53, 85–92 [žiūrėta 2020-05-11]. Prieiga per: doi:10.1016/j.indcrop.2013.12.018.
55. DEBBACHE-BENAIIDA, N., et al. Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [interaktyvus]. 2013, 3(9), 697–704 [žiūrėta 2021-02-15]. Prieiga per: doi:10.1016/S2221-1691(13)60141-0.
56. PENG, S., et al. Beneficial effects of poplar buds on hyperglycemia, dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation in streptozotocin-induced type-2 diabetes. *Journal of Immunology Research* [interaktyvus]. 2018 [žiūrėta 2021-02-15]. Prieiga per: doi:10.1155/2018/7245956.
57. OANCEA, I. A., et al. Analytical characterisation of some buds of etheric oils used in cosmetics. *Revue Roumaine de Chimie* [interaktyvus]. 2017, 62(6–7), 511–516 [žiūrėta 2021-02-15]. Prieiga per: <http://web.icf.ro/rrch/>.
58. RASUL, A., et al. Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Research International* [interaktyvus]. 2013 [žiūrėta 2021-02-16]. Prieiga per: doi:10.1155/2013/379850.
59. DEBBACHE-BENAIIDA, N., et al. Anti-hyperuricemic and neuroprotective effects of *Populus nigra* L. (Saliacaceae) flower buds used in Algerian folk medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*. 2018, 6(6), 471–482, ISSN 0719-4250.
60. PRIOR, R. L., et al. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, 53(10), 4290–4302 [žiūrėta 2021-04-08]. Prieiga per: doi:10.1021/jf0502698.
61. LOBO, V., et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [interaktyvus]. 2010, 4(8), 118–126 [žiūrėta 2020-05-08]. Prieiga per: doi: 10.4103/0973-7847.70902.
62. SCHIEBER, M. ir N. S. CHANDEL. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* [interaktyvus]. 2014, 24(10), 453–462 [žiūrėta 2020-05-08]. Prieiga per: doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.
63. BINO, S. DEL, et al. Clinical and biological characterization of skin pigmentation diversity and its consequences on UV impact. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2018, 19(9), 26–68 [žiūrėta 2021-02-12]. Prieiga per: doi:10.3390/ijms19092668.
64. HANDEL, A. C., et al. Melasma: A clinical and epidemiological review. *Anais Brasileiros de Dermatologia* [interaktyvus]. 2014, 89(5), 771–782 [žiūrėta 2021-02-12]. Prieiga per: doi: 10.1590/abd1806-4841.20143063.
65. PILLAIYAR, T., et al. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2017, 32(1), 403–425 [žiūrėta 2021-02-12]. Prieiga per: doi:10.1080/14756366.2016.1256882.
66. BONDAR, A., et al. Technological aspects of obtaining liquid extracts of black poplar buds and

- determining the strategy for their standardization at the pharmaceutical development stage. *ScienceRise: Pharmaceutical Science* [interaktyvus]. 2020, 23(1), 10–16 [žiūrėta 2020-04-29]. Prieiga per: doi:10.15587/2519-4852.2020.197270.
67. YOUSEFI, M., et al. Supercritical fluid extraction of essential oils. *Trends in Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 2019, 118, 182–193 [žiūrėta 2021-05-02]. Prieiga per: doi:10.1016/j.trac.2019.05.038.
  68. DAI, J. ir R. J. MUMPER. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* [interaktyvus]. 2010, 15, 7313-7352 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per: doi:10.3390/molecules15107313.
  69. HAMINIUK, C. W. I., et al. Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science & Technology* [interaktyvus]. 2012, 47(10), 2023–2044 [žiūrėta 2020-05-03]. Prieiga per: doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x.
  70. PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science* [interaktyvus]. 2018, 23(3), 173–182 [žiūrėta 2020-04-16]. Prieiga per: doi:10.1016/j.cofs.2017.11.012.
  71. ROYER, M., et al. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *PharmaNutrition* [interaktyvus]. 2013, 1(4), 158–167, 2013 [žiūrėta 2021-05-02]. Prieiga per: doi:10.1016/j.phanu.2013.05.001.
  72. HANDA, S. S., et al. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. *International Centre for Science and High Technology* [interaktyvus]. 2008 [žiūrėta 2020-04-23].
  73. PIETRZAK, W., et al. LC-ESI-MS/MS identification of biologically active phenolic compounds in mistletoe berry extracts from different host trees. *Molecules* [interaktyvus]. 2017, 22(4) [žiūrėta 2021-05-05]. Prieiga per: doi:10.3390/molecules22040624.
  74. MANDAL, S. C., et al. Classification of Extraction Methods. *Essentials of Botanical Extraction* [interaktyvus]. 2015, 83–136 [žiūrėta 2020-05-14]. Prieiga per: doi:10.1016/b978-0-12-802325-9.00006-9.
  75. STANCIAUSKAITE, M., et al. Extracts of Poplar Buds ( *Populus balsamifera* L., *Populus nigra* L.) and Lithuanian Propolis : Comparison of Their Composition and Biological Activities. *Plants* [interaktyvus]. 2021, 10(5), 828 [žiūrėta 2021-04-29]. Prieiga per: doi:10.3390/plants10050828.
  76. BENEDEC, D., et al. Contrast between water- and ethanol-based antioxidant assays: Aspen (*Populus tremula*) and black poplar (*Populus nigra*) extracts as a case study. *Journal of Food Quality* [interaktyvus]. 2014, 37(4), 259–267 [žiūrėta 2021-04-29]. Prieiga per: doi:10.1111/jfq.12090.
  77. SOARES, J. F., et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of black poplar (*Populus nigra* L.) extract: Experimental data and fitting of kinetic parameters. *Journal of Supercritical Fluids* [interaktyvus]. 2016, 117, 270–278 [žiūrėta 2021-04-29]. Prieiga per: doi:10.1016/j.supflu.2016.07.005.
  78. AZMIR, J., et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus 2020-04-23]. 2013, 117(4), 426–436 [žiūrėta]. Prieiga per: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
  79. PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science* [interaktyvus]. 2018, 23(3), 173–182 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.cofs.2017.11.012.
  80. SAITO, M. History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [interaktyvus]. 2013, 115(6), 590–599 [žiūrėta 2020-04-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jbiosc.2012.12.008.
  81. WANG, W., et al. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Analytica Chimica Acta* [interaktyvus]. 2007, 602, 211–222 [žiūrėta 2020-05-16]. Prieiga per: doi:10.1016/j.aca.2007.09.023.
  82. SAINI, R. K. ir Y. S., KEUM. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food*

- Chemistry* [interaktyvus]. 2017, 240, 90–103 [žiūrėta 2021-05-10]. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.099.
83. GIERGIELEWICZ-MOZAJSKA, H., et al. Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples-Some Aspects of Theory and Practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 2001, 31(3), 149–165 [žiūrėta 2020-05-14]. Prieiga per: doi:10.1080/20014091076712.
  84. KITRYTĖ, V., et al. Zero waste biorefining of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) pomace into functional ingredients by consecutive high pressure and enzyme assisted extractions with green solvents *Food Chem.* 2020, 322. ISSN:18737072.
  85. FOURATI, M., et al. Multiresponse Optimization of Pomegranate Peel Extraction by Statistical versus Artificial Intelligence: Predictive Approach for Foodborne Bacterial Pathogen Inactivation. *Evidence-based Complementary Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2019 [žiūrėta 2021-05-10]. Prieiga per: doi:10.1155/2019/1542615.
  86. YOLMEH, M. ir S. M. JAFARI. Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food Bioprocess Technol.* [interaktyvus]. 2017, 10(3), 413–433 [žiūrėta 2021-05-09]. Prieiga per: doi:10.1007/s11947-016-1855-2.
  87. BEZERRA, M. A., et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* [interaktyvus]. 2008, 76(5), 965–977 [žiūrėta 2021-05-10]. Prieiga per: doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019.
  88. KIS, B., et al. Recent advances regarding the phytochemical and therapeutic uses of populus nigra L. Buds. *Plants* [interaktyvus]. 2020, 9(11), 1–17 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: doi:10.3390/plants9111464.
  89. RUBIOLO, P., et al. Populus nigra L. bud absolute: A case study for a strategy of analysis of natural complex substances. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [interaktyvus]. 2013, 405(4), 1223–1235 [žiūrėta 2021-03-12]. Prieiga per: doi:10.1007/s00216-012-6537-y.
  90. UPRETY, Y., et al. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: Review and perspectives. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* [interaktyvus]. 2012, 8(7) [žiūrėta 2021-03-02]. Prieiga per: doi:10.1186/1746-4269-8-7.
  91. Valstybinė vaistų kontrolės tarnyba, VVKT [žiūrėta 2020-05-14]. Prieiga per: <https://vapris.vvkt.lt/vvkt-web/public/medications?lang=en>.
  92. PRIOR, R. L., et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2003, 51(11), 3273–3279 [žiūrėta 2020-10-15]. Prieiga per: doi:10.1021/jf0262256.
  93. SINGLETON, V. L., et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* [interaktyvus]. 1999, 299, 152–178 [žiūrėta 2021-11-20]. Prieiga per: doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
  94. RE, R., et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine* [interaktyvus]. 1999, 26(9–10), 1231–1237 [žiūrėta 2020-10-15]. Prieiga per: doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
  95. LOŽIENE, K., et al. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2007, 103(2), 546–559 [žiūrėta 2021-04-06]. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2006.08.027.
  96. GROCHOWSKI, D. M., et al. In vitro enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of *Potentilla thuringiaca*. *Phytochemistry Letters* [interaktyvus]. 2017, 20, 365–372 [žiūrėta 2021-02-19]. Prieiga per: doi:10.1016/j.phytol.2017.03.005.
  97. LICHTENTHALER, H. K. ir C., BUSCHMANN. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 2001, 1(1), 4.3.1–4.3.8 [žiūrėta 2021-03-20]. Prieiga per:

- doi:10.1002/0471142913.faf0403s01.
98. MOUAHID, A., et al. Selective extraction of neutral lipids and pigments from *nannochloropsis salina* and *nannochloropsis maritima* using supercritical CO<sub>2</sub> extraction: Effects of process parameters and pre-treatment. *Journal of Supercritical Fluids* [interaktyvus]. 2020, 165, 104934 [žiūrėta 2021-03-20]. Prieiga per: doi:10.1016/j.supflu.2020.104934.
  99. SYRPAS, M., et al. High-pressure extraction of antioxidant-rich fractions from Shrubby cinquefoil (*Dasiphora fruticosa* L. Rydb.) leaves: Process optimization and extract characterization *Antioxidants* [interaktyvus]. 2020, 9(6) [žiūrėta 2021-05-06]. Prieiga per: doi:10.3390/antiox9060457.
  100. LIAZID, A., et al. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 2007, 1140, 29–34 [žiūrėta 2021-05-16]. Prieiga per: doi:10.1016/j.chroma.2006.11.040.
  101. SANTOS, D. T., et al. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins. *Journal of Food Engineering* [interaktyvus]. 2012, 108, 444–452 [žiūrėta 2021-05-16]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022.
  102. PEREZ-GALVEZ, A., et al. Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2020, 9(6), 505 [žiūrėta 2021-05-01]. Prieiga per: doi:10.3390/antiox9060505.
  103. LEFEBVRE, T., et al. Sequential extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and pigments (carotenoids and chlorophylls) from Rosemary by online supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 2020, 1639, 461709 [žiūrėta 2021-05-01]. Prieiga per: doi:10.1016/j.chroma.2020.461709.
  104. MERGHACHE, D., et al. Antioxidant and Antimicrobial Activities Of Algerian *Populus Nigra* L. Buds Extracts. *Bioscience & Engineering : An International Journal* [interaktyvus]. 2016, 3(1–2) [žiūrėta 2021-02-09]. Prieiga per: doi:10.5121/bioej.2016.3201.
  105. HAVLIK, J., et al. Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* [interaktyvus]. 2010, 132(2), 461–465 [žiūrėta 2021-02-09]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jep.2010.08.044.
  106. BANKOVA, V., et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research* [interaktyvus]. 2019, 58(2), 1–49 [žiūrėta 2021-02-09]. Prieiga per: doi:10.1080/00218839.2016.1222661.
  107. ZHANG, J., et al. Comparisons of ethanol extracts of Chinese propolis (poplar type) and poplar gums based on the antioxidant activities and molecular mechanism. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [interaktyvus]. 2015 [žiūrėta 2021-05-29]. Prieiga per: doi:10.1155/2015/307594.
  108. ZHANG, F., et al. From green to red: large-scale transcriptome comparison of a bud sport in poplar (*Populus deltoides*). *Acta Physiologiae Plantarum* [interaktyvus]. 2016, 244(38) [žiūrėta 2021-02-09]. Prieiga per: doi:10.1007/s11738-016-2259-7.
  109. POBLOCKA-OLECH, L., et al. TLC determination of some flavanones in the buds of different genus *Populus* species and hybrids. *Acta Pharm* [interaktyvus]. 2018, 68, 199–210 [žiūrėta 2021-03-03]. Prieiga per: doi:10.2478/acph-2018-0018.
  110. SAITO, K., et al. Confirmation of synthetic cannabinoids in herb and blood by HS-SPME-GC/MS. *Forensic Chemistry* [interaktyvus]. 2019, 13, 100-156 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: doi:10.1016/j.forc.2019.100156.
  111. PIOCHON-GAUTHIER, M., et al. The essential oil of *Populus balsamifera* buds: Its chemical composition and cytotoxic activity. *Natural Product Communications* [interaktyvus]. 2014, 9(2), 257–260 [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi:10.1177/1934578x1400900231.
  112. DARWISH, R. S., et al. Evaluation of the effect of seasonal variation and organ selection on the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of oriental-cedar (*Platyclaudus orientalis* (L.) Franco). *Journal of Essential Oil Research* [interaktyvus]. 2021, 33(1), 69–79 [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per:

- per: doi:10.1080/10412905.2020.1829509.
113. SHIN, Y. ir Y. LEE. Cytotoxic activity from *Curcuma zedoaria* through mitochondrial activation on ovarian cancer cells. *Toxicological Research* [interaktyvus]. 2013, 29(4), 257–261 [žiūrėta 2021-04-16]. Prieiga per: doi:10.5487/TR.2013.29.4.257.
  114. CHEN, Y., et al. Characterization of volatile organic compounds in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) from Myanmar. *Metabolites* [interaktyvus]. 2021, 11(1), 1–10 [žiūrėta 2021-04-16]. Prieiga per: doi:10.3390/metabo11010021.
  115. VILA, R., et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of  $\alpha$ -bisabolol. *Bioresource Technology* [interaktyvus]. 2010, 101, 2510–2514 [žiūrėta 2021-04-16]. Prieiga per: doi:10.1016/j.biortech.2009.11.021.
  116. COSTA, E. V., et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteropsis* species. *Phytochemistry* [interaktyvus]. 2008, 69(9), 1895–1899 [žiūrėta 2021-04-16]. Prieiga per: doi:10.1016/j.phytochem.2008.03.005.
  117. PEREIRA, I., et al. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [interaktyvus]. 2018, 171, 566–578 [žiūrėta 2021-04-16]. Prieiga per: doi:10.1016/j.colsurfb.2018.08.001.
  118. MY, T. T. A., et al. Evaluation of the Inhibitory Activities of COVID-19 of Melaleuca cajuputi Oil Using Docking Simulation. *ChemistrySelect* [interaktyvus]. 2020, 5(21), 6312–6320 [žiūrėta 2021-05-11]. Prieiga per: doi:10.1002/slct.202000822.
  119. TOCMO, R., et al. Valorization of pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) peel: A review of current utilization, phytochemistry, bioactivities, and mechanisms of action. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [interaktyvus]. 2020, 19, 1969–2012 [žiūrėta 2021-03-03]. Prieiga per: doi:10.1111/1541-4337.12561.
  120. KO, M. J., et al. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2014, 143, 147–155 [žiūrėta 2021-05-18]. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.104.
  121. KITRYTĖ, V., et al. Biorefining of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) threshing residues into cannabinoid and antioxidant fractions by supercritical carbon dioxide, pressurized liquid and enzyme-assisted extractions. *Food Chemistry*. 2018, 267, 420–429. ISSN 18737072
  122. WECKESSER, S., et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine* [interaktyvus 2021-03-03]. 2007, 14, 508–516 [žiūrėta]. Prieiga per: doi:10.1016/j.phymed.2006.12.013.
  123. NOBILE, C. J. ir A. D. JOHNSON. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol* [interaktyvus]. 2015, 69, 71–92 [žiūrėta 2021-05-18]. Prieiga per: doi:10.1146/annurev-micro-091014-104330.
  124. GANNESSEN, A. V., et al. Regulation of Monospecies and Mixed Biofilms Formation of Skin *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* by Human Natriuretic Peptides. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. 2018, 9 [žiūrėta 2021-05-25]. Prieiga per: doi:10.3389/fmicb.2018.02912.
  125. ABIRAMI, P., et al. Preliminary study on the antimicrobial activity of *Enicostemma littorale* using different solvents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [interaktyvus]. 2012, 5(7), 552–555 [žiūrėta 2021-05-25]. Prieiga per: doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60097-2.
  126. CHIOCCHIO, M., et al. Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest *Industrial Crops & Products* [interaktyvus]. 2018, 122, 498–505 [žiūrėta 2021-05-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.indcrop.2018.06.029.
  127. CHO, K., et al. Potential adverse effect of tyrosinase inhibitors on teleosts: A review. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* [interaktyvus] 2020, 228 [žiūrėta 2021-05-27]. Prieiga per: doi:10.1016/j.cbpc.2019.108655.
  128. QU, Y., et al. Catalysis-based specific detection and inhibition of tyrosinase and their application. *Journal*

- of *Pharmaceutical Analysis* [interaktyvus]. 2020, 10, 414–425 [žiūrėta 2021-05-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.jpha.2020.07.004.
129. YUAN, Y., et al. Tyrosinase inhibitors as potential antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 187 [žiūrėta 2021-05-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.ejmech.2019.111892.
  130. SVEČNJAK, L., et al. Mediterranean propolis from the adriatic sea islands as a source of natural antioxidants: Comprehensive chemical biodiversity determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP assay. *Antioxidants* [interaktyvus]. 2020, 9, 337 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: doi:10.3390/antiox9040337.
  131. ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology* [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2021-04-05]. ISBN 9781932633214. Prieiga per: 10.1016/0305-1978(96)83708-2.
  132. SKALTSIA, H. D., et al. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry* [interaktyvus]. 2003, 64, 743–752 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: doi:10.1016/S0031-9422(03)00386-8.
  133. CARDEAL, Z. L., et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [interaktyvus]. 2006, 20, 2823–2836 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: doi:10.1002/rcm.
  134. ANDRIAMAHARAVO, N. R. NIST Mass Spectrometry Data Center. NIST Mass Spectrometry Data Center. 2014.
  135. NASCIMENTO, M. N. G., et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Xylopia aromatica* (Annonaceae) flowers and leaves. *Revista Virtual de Quimica* [interaktyvus]. 2018, 10(5), 1578–1590 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: doi:10.21577/1984-6835.20180107.
  136. ČAJKA, T., et al. Solid phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the analysis of honey volatiles. *Journal of Separation Science* [interaktyvus]. 2007, 30(4), 534–546 [žiūrėta 2021-04-05]. Prieiga per: doi:10.1002/jssc.200600413.
  137. BIERI, S. ir P. J. MARRIOTT. Dual-injection system with multiple injections for determining bidimensional retention indexes in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 2008, 80(3), 760–768 [žiūrėta 2021-04-07].
  138. RAMIREZ, R. ir R. CAVA. Volatile profiles of dry-cured meat products from three different Iberian x Duroc genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2007, 55(5), 1923–1931 [žiūrėta 2021-04-07]. Prieiga per: doi:10.1021/jf062810l.
  139. PINO, J. A., et al. Characterization of volatiles in strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2001, 49(12), 5883–5887 [žiūrėta 2021-04-07]. Prieiga per: doi: 10.1021/jf010414r.
  140. LEFFINGWELL, J. C. ir E. D. ALFORD. Volatile constituents of perique tobacco. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, 4(2), 899–915 [žiūrėta 2021-04-07]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/228489250>.
  141. ASUMING, W. A., et al. Essential oil composition of four *Lomatium* Raf. species and their chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology* [interaktyvus]. 2005, 33(1), 17–26 [žiūrėta 2021-04-07]. Prieiga per: doi:10.1016/j.bse.2004.06.005.
  142. WILKES, H., et al. Formation of n-alkane- and cycloalkane-derived organic acids during anaerobic growth of a denitrifying bacterium with crude oil. *Organic Geochemistry* [interaktyvus]. 2003, 34(9), 1313–1323 [žiūrėta 2021-04-07]. Prieiga per: doi:10.1016/S0146-6380(03)00099-8.
  143. LUCERO, M. E., et al. The Essential Oil Composition of *Psoralea scoparius* (A. Gray) Rydb. *Journal of Essential Oil Research* [interaktyvus]. 2011, 15(2), 108–111 [žiūrėta 2021-04-13]. Prieiga per: doi:10.1080/10412905.2003.9712083.

144. FLAMINI, G., et al. Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus] 2003, 998, 229–233 [žiūrėta 2021-04-13]. Prieiga per: doi:10.1016/S0021-9673(03)00641-1.
145. DICKSCHAT, J. S., et al. Novel fatty acid methyl esters from the actinomycete *Micromonospora aurantiaca*. *Beilstein J. Org. Chem* [interaktyvus]. 2011, 7, 1697-1712 [žiūrėta 2021-04-13]. Prieiga per: doi:10.3762/bjoc.7.200.
146. XU, X., et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere. *Atmospheric Chemistry and Physics* [interaktyvus]. 2003, 3, 665–682 [žiūrėta 2021-04-13]. Prieiga per: doi:10.5194/acp-3-665-2003.
147. FANG, Y. ir M. QIAN. Aroma compounds in Oregon Pinot Noir wine determined by aroma extract dilution analysis (AEDA). *Flavour and Fragrance Journal* [interaktyvus]. 2005, 20, 22–29 [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi:10.1002/ffj.1551.
148. PENG, C. T., et al. Prediction of retention indexes. *Journal of Chromatography* [interaktyvus]. 1988, 436, 137–172 [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi:10.1016/s0021-9673(00)94575-8.
149. DICKSCHAT, J. S., et al. Biosynthesis and identification of volatiles released by the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *ChemBioChem* [interaktyvus]. 2005, 6, 2023–2033 [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi:10.1002/cbic.200500174.
150. BACCOURI, B., et al. Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils from five new cultivars. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2006, 102(2007), 850–856 [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.012.
151. FLAMINI, G., et al. A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey. *Plant Systematics and Evolution* [interaktyvus]. 2006, 261, 217–228 [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi:10.1007/s00606-006-0448-3.
152. ROSTAD, C. E ir W. E. PEREIRA. Kovats and lee retention indices determined by gas chromatography/mass spectrometry for organic compounds of environmental interest. *Journal of High Resolution Chromatography* [interaktyvus]. 1986, 9(6), 328–334 [žiūrėta 2021-04-15]. Prieiga per: doi:10.1002/jhrc.1240090603.

## **Publikacijų sąrašas**

### **Mokslinių tyrimų rezultatų skelbimas konferencijose**

**Greta Kvietkutė**, Michail Syrpas, Petras Rimantas Venskutonis, Vaida Kitrytė. Aukštesnės pridėtinės vertės komponentų išskyrimas iš balzaminių tuopų (*Populus balsamifera* L.) pumpurų: ekstrakcijos aukšto slėgio tirpikliais proceso optimizavimas ir ekstraktų charakterizavimas. Tezės ir žodinis pranešimas pristatytas Respublikinėje studentų mokslinėje konferencijoje „Chemija ir cheminė technologija 2021“, Kaunas, 2021-05-15.

## Priedai

**1 priedas. *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH temperatūros ir laiko įtaka bendram ekstraktų fenolinių junginių kiekiui, in vitro deguonies radikalų sujungimo gebai, pigmentų (karotinoidų ir chlorofilų) bei tikslinių fenolinių junginių (pinocembrino ir pinostrobino) kiekiams**

EPS-EtOH parametrai		Priklausomi kintamieji							
T, °C	τ, min	BFJK, mg GRE/g E	TEAG <sub>ORAC</sub> , mg TE/g E	BKK, μg/g E	Chlorofilo a kiekis, μg/g E	Chlorofilo b kiekis, μg/g E	BCK, μg/g E	Pinocembrino kiekis, mg/g E	Pinostrobino kiekis, mg/g E
40	45	161,66±0,00	2859,36±202,26	192,30±0,07	87,86±0,65	75,72±0,24	163,58±0,41	51,15±3,11	15,57±0,26
60	45	133,45±3,73	2197,73±160,67	184,31±0,47	95,43±0,60	79,35±1,06	174,78±1,30	44,77±0,00	13,59±0,00
60	15	150,96±1,81	2521,70±20,25	215,38±0,34	95,29±0,65	80,70±0,24	175,99±0,41	18,42±0,00	8,12±0,18
80	30	164,54±1,73	2657,43±127,57	235,42±0,31	110,62±0,12	93,06±1,16	203,68±1,04	54,08±0,79	15,35±0,16
80	45	150,60±3,55	2262,24±8,68	184,06±0,26	110,23±0,65	91,59±1,13	201,82±1,78	55,29±0,31	14,21±0,06
60	30	155,65±2,53	2315,03±71,25	235,24±0,07	95,73±0,12	79,89±1,16	175,62±1,04	48,39±2,80	16,03±0,75
60	30	155,65±2,53	2315,03±71,25	235,24±0,07	95,73±0,12	79,89±1,16	175,62±1,04	46,41±0,00	15,50±0,00
40	30	155,77±2,23	2616,30±38,91	211,35±0,28	77,47±0,92	67,97±1,59	145,44±2,51	47,19±1,01	15,78±0,22
60	30	154,93±2,54	2315,03±71,25	235,24±0,07	95,73±0,12	79,89±1,16	175,62±1,04	50,37±0,00	16,56±0,00
80	15	150,12±0,00	2859,40±293,00	205,85±0,34	93,97±0,65	104,43±0,24	198,40±0,41	46,65±4,39	13,44±0,98
60	30	155,65±2,53	2315,03±71,25	235,24±0,07	95,73±0,12	79,89±1,16	175,62±1,04	48,39±2,80	16,03±0,75
40	15	156,49±2,84	2824,58±61,12	191,77±0,14	65,58±0,68	60,78±2,03	126,36±1,85	19,67±0,15	8,51±0,11
60	30	155,65±2,53	2315,03±71,25	235,24±0,07	95,73±0,12	79,89±1,16	175,62±1,04	48,39±2,80	16,03±0,75

EPS-EtOH – ekstrakcija padidintame slėgyje etanoliu; E – ekstraktas; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; GRE – galo rūgšties ekvivalentas; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; TE – Trolokso ekvivalentas; BKK – bendras karotinoidų kiekis; BCK – bendras chlorofilų kiekis.

**2 priedas. Centriškai kompozicinių *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH modelių dispersinė analizė pagal kintamąsias vertes**

Kintamieji	Kvadratų suma	Kvadratų vidurkis	F – kriterijus	p – reikšmė
<b>EPS-EtOH ekstraktų išeiga, g/100 g TP</b>				
Modelis	335,15	167,58	178,72	<0,0001*
T – Temperatūra	309,03	309,03	329,58	<0,0001*
$\tau$ – Laikas	26,13	26,13	27,86	0,0004*
Liekana (angl. <i>residual</i> )	9,38	0,9376	–	–
Klaidos tikimybė	7,14	1,19	2,13	0,2417**
<b>BFJK, mg GRE/g TP</b>				
Modelis	804,69	160,94	43,79	<0,0001*
T – Temperatūra	706,55	706,55	192,26	<0,0001*
$\tau$ – Laikas	19,05	19,05	5,18	0,0569**
T $\tau$	0,0004	0,0004	0,0001	0,9920**
T <sup>2</sup>	50,56	50,56	13,76	0,0076*
$\tau^2$	58,48	58,48	15,91	0,0053*
Liekana (angl. <i>residual</i> )	25,73	3,68	–	–
Klaidos tikimybė	21,23	7,08	6,30	0,0537**
<b>TEAGORAC, mg TE/g TP</b>				
Modelis	2,396E+05	47923,14	134,69	<0,0001*
T – Temperatūra	1,338E+05	1,338E+05	376,06	<0,0001*
$\tau$ – Laikas	3700,17	3700,17	10,40	0,0146*
T $\tau$	19740,25	19740,25	55,48	0,0001*
T <sup>2</sup>	64187,98	64187,98	180,40	<0,0001*
$\tau^2$	793,34	793,34	2,23	0,1790**
Liekana (angl. <i>residual</i> )	2490,62	355,80	–	–
Klaidos tikimybė	1971,42	657,14	5,06	0,0756**
<b>BKK, <math>\mu</math>g/g TP</b>				
Modelis	2705,96	541,19	93,44	<0,0001*
T – Temperatūra	1683,71	1683,71	290,72	<0,0001*
$\tau$ – Laikas	0,5891	0,5891	0,1017	0,7591**
T $\tau$	12,50	12,50	2,16	0,1853**
T <sup>2</sup>	39,19	39,19	6,77	0,0354*
$\tau^2$	697,54	697,54	120,44	<0,0001*
Liekana (angl. <i>residual</i> )	40,54	5,79	–	–
Klaidos tikimybė	28,19	9,40	3,04	0,1551**
<b>Chlorofilo a kiekis, <math>\mu</math>g/g TP</b>				
Modelis	1261,35	630,67	452,97	<0,0001*
T – Temperatūra	1158,43	1158,43	832,02	<0,0001*
$\tau$ – Laikas	102,92	102,92	73,92	<0,0001*

## 2 priedas. Tęsinys

Kintamieji	Kvadratų suma	Kvadratų vidurkis	F – kriterijus	p – reikšmė
Liekana (angl. <i>residual</i> )	13,92	1,39	–	–
Klaidos tikimybė	11,87	1,98	3,86	0,1061**
<b>Chlorofilo b kiekis, µg/g TP</b>				
Modelis	1934,54	386,91	366,30	<0,0001*
T – Temperatūra	1837,15	1837,15	1739,29	<0,0001*
τ – Laikas	46,59	46,59	44,11	0,0003*
Tτ	25,50	25,50	24,14	0,0017*
T <sup>2</sup>	18,75	18,75	17,75	0,0040*
τ <sup>2</sup>	0,5123	0,5123	0,4850	0,5086**
Liekana (angl. <i>residual</i> )	7,39	1,06	–	–
Klaidos tikimybė	6,09	2,03	6,23	0,0548**
<b>BCK, µg/g TP</b>				
Modelis	6234,89	2078,30	340,34	<0,0001*
T – Temperatūra	5914,50	5914,50	968,54	<0,0001*
τ – Laikas	288,01	288,01	47,16	<0,0001*
Tτ	32,38	32,38	5,30	0,0468*
Liekana (angl. <i>residual</i> )	54,96	6,11	–	–
Klaidos tikimybė	48,34	9,67	5,84	0,0560**
<b>Pinocembrino kiekis, mg/g TP</b>				
Modelis	525,88	105,18	26,85	0,0002*
T – Temperatūra	218,29	218,29	55,73	0,0001*
τ – Laikas	236,38	236,38	60,35	0,0001*
Tτ	8,97	8,97	2,29	0,1740**
T <sup>2</sup>	19,08	19,08	4,87	0,0631**
τ <sup>2</sup>	59,89	59,89	15,29	0,0058*
Liekana (angl. <i>residual</i> )	27,42	3,92	–	–
Klaidos tikimybė	26,22	8,74	29,15	0,0035*
<b>Pinostrobino kiekis, mg/g TP</b>				
Modelis	28,38	5,68	19,92	0,0005*
T – Temperatūra	8,52	8,52	29,91	0,0009*
τ – Laikas	11,82	11,82	41,48	0,0004*
Tτ	0,8281	0,8281	2,91	0,1320**
T <sup>2</sup>	0,0394	0,0394	0,1384	0,7209**
τ <sup>2</sup>	6,51	6,51	22,86	0,0020*
Liekana (angl. <i>residual</i> )	1,99	0,2849	–	–
Klaidos tikimybė	1,91	0,6360	29,54	0,0034*

\* - statistiškai reikšmingas kintamasis; \*\* – statistiškai nereikšmingas kintamasis; EPS-EtOH – ekstrakcija papildintame slėgyje etanolis; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; BKK – bendras karotinoidų kiekis; BCK – bendras chlorofilų kiekis.

**3 priedas. Koreliacijos matrica tarp *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH priklausomų kintamųjų verčių, išreikštų gramams tuopų pumpurų**

Priklausomi kintamieji	EPS-EtOH išeiga, g/100 g TP	BFJK, mg GRE/g TP	TEAG <sub>ORAC</sub> , mg TE/g TP	BKK, µg/g TP	Chlorofilo a kiekis, µg/g TP	Chlorofilo b kiekis, µg/g TP	BCK, µg/g TP	Pinocembrino kiekis, mg/g TP	Pinostrobino kiekis, mg/g TP
EPS-EtOH išeiga, g/100 g TP	1	0,9049****	0,6495*	0,7252**	0,9830****	0,9596****	0,9759****	0,7796**	0,6786*
BFJK, mg GRE/g TP		1	0,7426**	0,8185***	0,9356****	0,9404****	0,9439****	0,7520**	0,6542*
TEAG <sub>ORAC</sub> , mg TE/g TP			1	0,3848 <sup>ns</sup>	0,6675*	0,8003**	0,7453**	0,4356 <sup>ns</sup>	0,2434 <sup>ns</sup>
BKK, µg/g TP				1	0,7659**	0,7224**	0,7463**	0,6157*	0,6800*
Chlorofilo a kiekis, µg/g TP					1	0,9758****	0,9926****	0,7771**	0,6799*
Chlorofilo b kiekis, µg/g TP						1	0,9951****	0,7251**	0,6017*
BCK, µg/g TP							1	0,7528**	0,6405*
Pinocembrino kiekis, mg/g TP								1	0,9608****
Pinostrobino kiekis, mg/g TP									1

TP – tuopų pumpurai; EPS-EtOH – ekstrakcija padidintame slėgyje etanoliu; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; BKK – bendras karotinoidų kiekis; BCK – bendras chlorofilų kiekis; GRE – Galo rūgšties ekvivalentai; TE – Trolokso ekvivalentai; \*\*\*\*: reikšminga koreliacija,  $p < 0,0001$ ; \*\*\*: reikšminga koreliacija,  $p = 0,0001-0,001$ ; \*\*: reikšminga koreliacija,  $p = 0,001-0,01$ ; \*: reikšminga koreliacija,  $p = 0,01-0,05$ ; <sup>ns</sup>: nereikšminga koreliacija,  $p > 0,05$ .

**4 priedas. Koreliacijos matrica tarp *P. balsamifera* pumpurų EPS-EtOH tarp priklausomų kintamųjų verčių, išreikštų gramui ekstrakto**

Priklausomi kintamieji	BFJK, mg GRE/g E	TEAG <sub>ORAC</sub> , mg TE/g E	BKK, µg/g E	Chlorofilo a kiekis, µg/g E	Chlorofilo b kiekis, µg/g E	BCK, µg/g E	Pinocembrino kiekis, mg/g E	Pinostrobino kiekis, mg/g E
BFJK, mg GRE/g E	1	0,4372 <sup>ns</sup>	0,4756 <sup>ns</sup>	-0,0457 <sup>ns</sup>	-0,0907 <sup>ns</sup>	-0,0717 <sup>ns</sup>	0,1466 <sup>ns</sup>	0,2381 <sup>ns</sup>
TEAG <sub>ORAC</sub> , mg TE/g E		1	-0,2986 <sup>ns</sup>	-0,4789 <sup>ns</sup>	-0,0197 <sup>ns</sup>	-0,2752 <sup>ns</sup>	-0,2906 <sup>ns</sup>	-0,3613 <sup>ns</sup>
BKK, µg/g E			1	0,2732 <sup>ns</sup>	0,0998 <sup>ns</sup>	0,2022 <sup>ns</sup>	0,21034 <sup>ns</sup>	0,4559 <sup>ns</sup>
Chlorofilo a kiekis, µg/g E				1	0,7661 <sup>**</sup>	0,9447 <sup>****</sup>	0,5759 <sup>*</sup>	0,3889 <sup>ns</sup>
Chlorofilo b kiekis, µg/g E					1	0,9345 <sup>****</sup>	0,4563 <sup>ns</sup>	0,2089 <sup>ns</sup>
BCK, µg/g E						1	0,5518 <sup>ns</sup>	0,3219 <sup>ns</sup>
Pinocembrino kiekis, mg g/ E							1	0,9197 <sup>****</sup>
Pinostrobino kiekis, mg/g E								1

E – ekstraktas; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; BKK – bendras karotinoidų kiekis; BCK – bendras chlorofilų kiekis; GRE – Galo rūgšties ekvivalentai; TE – Trolokso ekvivalentai; \*\*\*\*: reikšminga koreliacija,  $p < 0,0001$ ; \*\*\*: reikšminga koreliacija,  $p = 0,0001-0,001$ ; \*\*: reikšminga koreliacija,  $p = 0,001-0,01$ ; \*: reikšminga koreliacija,  $p = 0,01-0,05$ ; <sup>ns</sup>: nereikšminga koreliacija,  $p > 0,05$ .

**5 priedas. *P.balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto (78 °C, 18 min) priklausomų kintamųjų verčių atitikimas modeliui**

<b>Priklausomi kintamieji</b>	<b>Prognozuojama vidutinė vertė</b>	<b>Prognozuojama standartinė paklaida</b>	<b>Žemas pasikliautinis intervalas, 95 %</b>	<b>Eksperimentinė vertė</b>	<b>Aukštas pasikliautinis intervalas, 95 %</b>
EPS-EtOH ekstrakto išeiga, g/100 g TP	51,88±0,97	1,11	49,40	53,46±0,56	54,35
BFJK, mg GRE/g TP	81,55±1,92	2,34	76,02	79,74±1,07	87,07
TEAG <sub>ORAC</sub> , mg TE/g TP	1427,76±18,86	23,00	1373,38	1459,85±114,06	1482,14
BKK, µg/g TP	113,78±2,41	2,93	106,84	107,43±0,18	120,72
Chlorofilo a kiekis, µg/g TP	54,07±1,18	1,36	51,05	52,24±0,00	57,09
Chlorofilo b kiekis, µg/g TP	53,59±1,03	1,25	50,63	53,82±0,00	56,55
BCK, µg/g TP	106,91±2,47	2,97	100,18	106,06±0,00	113,64
Pinocembrino kiekis, mg g/ TP	23,02±1,98	2,41	17,32	27,49±0,28	28,73
Pinostrobino kiekis, mg/g TP	6,84±0,53	0,65	5,30	7,01±0,28	8,38

EPS-EtOH – ekstrakcija padidintame slėgyje etanoliu; GRE – galo rūgšties ekvivalentas; TE – Trolokso ekvivalentas; TP – tuopų pumpurai; BFJK – bendras fenolinių junginių kiekis; TEAG – Trolokso ekvivalento antioksidacinė geba; BKK – bendras karotinoidų kiekis; BCK – bendras chlorofilų kiekis; Vertės g/TP buvo apskaičiuotos įvertinus ekstrakto išeigą.

6 priedas. *P.balsamifera* pumpurų EPS-EtOH ekstrakto (78 °C, 18 min) viršerdvės lakiųjų junginių kokybinė ir kiekybinė sudėtis

Junginys	Tikslī masė	LSI <sub>apsk</sub>	LSI <sub>lit</sub>	DC smailės plotas x 10 <sup>6</sup>	Kiekis, %	Kvapo tipas: apibūdinimas <sup>(C, D)</sup>
<b>Angliavandeniliniai monoterpenai</b>						
Limonenas	136,1252	1039	1036 <sup>[130]</sup>	3,21±1,08	≤0,05	Citrusų: gaivus, saldus, apelsinų
Kogirenas	162,1409	1302	1285 <sup>[131]</sup>	67,94±8,78	0,10±0,01	
NI <sup>I</sup>	162,1409	1319		57,57±4,62	0,09±0,01	
1,8-dimetiltetralinas	160,1252	1343	1344 <sup>A</sup>	61,15±8,79	0,09±0,01	
NI <sup>I</sup>	162,1409	1345		7,41±0,96	≤0,05	
NI <sup>I</sup>	160,1252	1683		42,71±3,61	0,06±0,00	
<b>Iš viso:</b>				<b>239,99</b>	<b>0,35 %</b>	
<b>Oksiduoti monoterpenai</b>						
<i>Cis</i> -linalolio oksidas (furanoidinis)	170,1307	1082	1067 <sup>[131]</sup>	30,49±0,17	≤0,05	Žemės: žemės, gėlių, saldus, medienos
<i>Trans</i> -linalolio oksidas (furanoidinis)	170,1307	1099	1084 <sup>[131]</sup>	7,24±1,81	≤0,05	Gėlių
Linalolis	154,1358	1106	1103 <sup>[130]</sup>	131,96±15,20	0,19±0,03	Gėlių: citrusų, gėlių, saldus, rožių, mėlynių, medienos
NI <sup>II</sup>	170,1307	1139		20,34±0,55	≤0,05	
NI <sup>II</sup>	170,1307	1144		45,47±0,18	0,07±0,00	
<i>Cis</i> -linalolio oksidas (piranoidinis)	170,1307	1172	1170 <sup>[131]</sup>	13,45±0,14	≤0,05	
α-terpineolis	154,1358	1201	1195 <sup>[130]</sup>	2,21±0,43	≤0,05	Terpenų: pušų, terpenų, alyvų, citrusų, medienos, gėlių
β-ciklocitralis	152,1201	1226	1225 <sup>[130]</sup>	17,48±6,76	≤0,05	Tropinis: šafrano, rožių, žolelių, tabako, saldus, vaisių
NI <sup>II</sup>	154,1358	1280		20,54±1,99	≤0,05	
<b>Iš viso:</b>				<b>289,18</b>	<b>0,43 %</b>	

## 6 priedas. Tęsinys

Junginys	Tiksli masė	LSI <sub>apsk</sub>	LSI <sub>lit</sub>	DC smailės plotas x 10 <sup>6</sup>	Kiekis, %	Kvapo tipas: apibūdinimas <sup>(C, D)</sup>
<b>Angliavandeniliniai seskviterpenai</b>						
Pregeirenas B	162,1409	1273	1274 <sup>[131]</sup>	6,71±0,61	≤0,05	
NI <sup>III</sup>	204,1878	1340		20,44±1,75	≤0,05	
α-kubebenas	204,1878	1354	1355 <sup>[130]</sup>	3,52±1,16	≤0,05	Žolelių: žolelių, vaško
Longiciklenas	204,1878	1367	1374 <sup>[130]</sup>	33,59±4,65	≤0,05	
β-elemenas	204,1878	1378	1390 <sup>[131]</sup>	20,67±1,93	≤0,05	Žolelių: žolelių, vaško, gaivus
α-ilangenas	204,1878	1382	1371 <sup>[130]</sup>	953,66±56,98	1,40±0,05	Vaisių
α-kopaenas	204,1878	1388	1378 <sup>[130]</sup>	688,52±7,05	1,01±0,01	Medienos: medienos, aštrus, medaus
NI <sup>III</sup>	204,1878	1393		64,68±6,58	0,10±0,01	
NI <sup>III</sup>	202,1722	1397		31,50±2,84	≤0,05	
NI <sup>III</sup>	204,1878	1399		96,93±2,53	0,14±0,00	
Sativenas	204,1878	1408	1390 <sup>[131]</sup>	335,85±0,65	0,49±0,01	
α-neoklovenas	204,1878	1412	1454 <sup>[131]</sup>	117,08±21,44	0,17±0,03	
NI <sup>III</sup>	200,1565	1420		111,35±4,03	0,16±0,01	
<i>Cis</i> -α-bergamotenas	204,1878	1421	1414 <sup>[3]</sup>	1206,23±251,07	1,78±0,41	
α-kedrenas	204,1878	1432	1409 <sup>[3]</sup>	802,84±114,19	1,18±0,14	Medienos: medienos, kedro, saldus, gaivus
β-kariofilenas	204,1878	1432	1417 <sup>[3]</sup>	585,16±55,70	0,86±0,06	Aštrus: saldus, medienos, prieskonių, gvazdikėlių
<i>Trans</i> -α-bergamotenas	204,1878	1441	1435 <sup>[130]</sup>	2462,09±191,13	3,62±0,20	Medienos: žolelių
α-humulenas	204,1878	1452	1452 <sup>[3]</sup>	707,92±8,84	1,04±0,04	Medienos
β-(E)-farnezenas	204,1878	1458	1462 <sup>[111]</sup>	1649,68±9,09	2,43±0,04	Medienos: medienos, citrusų, žolelių, saldus
NI <sup>III</sup>	202,172; 204,1878	1461		242,47±45,18	0,36±0,07	
Aromandendrenas	204,1878	1466	1463 <sup>[130]</sup>	240,90±36,97	0,36±0,06	Saldus

## 6 priedas. Tęsinys

Junginys	Tikslī masē	LSI <sub>apsk</sub>	LSI <sub>lit</sub>	DC smailēs plotas x 10 <sup>6</sup>	Kiekis, %	Kvapo tipas: apibūdinimas <sup>(C, D)</sup>
NI <sup>III</sup>	204,1878	1470		2052,60±0,00	3,02±0,07	
NI <sup>III</sup>	202,1722	1474		1164,80±97,54	1,71±0,11	
10-epi-β-akoradienas	204,1878	1481	1474 <sup>[131]</sup>	96,85±2,67	0,14±0,00	
<i>Trans</i> -kadina-1(6),4-dienas	204,1878	1483	1475 <sup>[111]</sup>	73,52±0,00	0,11±0,00	
α-amorfenas	204,1878	1485	1479 <sup>[130]</sup>	820,36±0,00	1,21±0,03	Medienos
γ-kurkumenas	204,1878	1490	1479 <sup>[3]</sup>	5008,46±1336,80	7,34±1,80	
γ-murolenas	204,1878	1491	1479 <sup>[111]</sup>	683,74±7,77	1,01±0,02	Medienos: žolelių, medienos, prieskonių
Ar-kurkumenas	202,1722	1496	1482 <sup>[3]</sup>	2312,14±875,62	3,38±1,21	
α-murolenas	204,1878	1497	1503 <sup>[111]</sup>	5868,19±1060,11	8,61±1,37	Medienos
Eremofilenas	204,1878	1506	1503 <sup>[132]</sup>	954,94±7,80	1,40±0,04	
γ-amorfenas	204,1878	1508	1497 <sup>[111]</sup>	2394,11±519,95	3,51±0,69	
Epizonarenas	204,1878	1510	1502 <sup>[111]</sup>	1221,42±41,43	1,80±0,02	
NI <sup>III</sup>	204,1878	1513		862,23±0,00	1,27±0,03	
γ-gurjunenas	204,1878	1515	1490 <sup>[133]</sup>	627,52±13,07	0,92±0,00	Pelėsių, saldus, rožių, medienos
NI <sup>III</sup>	200,1565	1516		836,70±33,50	1,23±0,08	
<i>Trans</i> -kalamėnas	202,1722	1518	1522 <sup>[131]</sup>	434,60±20,02	0,64±0,04	
NI <sup>III</sup>	202,1722	1520		1307,79±0,00	1,92±0,04	
β-bisabolėnas	204,1878	1520	1513 <sup>[111]</sup>	657,83±40,18	0,97±0,08	Balzamiko: balzamiko, medienos, žolelių
β-kurkumėnas	204,1878	1521	1516 <sup>[111]</sup>	2955,83±960,47	4,36±1,51	
NI <sup>III</sup>	202,1722	1532		597,26±429,13	0,89±0,65	
δ-kadėnas	204,1878	1533	1522 <sup>[3]</sup>	1985,98±0,00	2,92±0,07	Žolelių: čiobrelėjų, žolelių, medienos
NI <sup>III</sup>	204,1878	1535		789,27±0,00	1,16±0,03	

## 6 priedas. Tęsinys

Junginys	Tikslī masē	LSI <sub>apsk</sub>	LSI <sub>lit</sub>	DC smailēs plotas x 10 <sup>6</sup>	Kiekis, %	Kvapo tipas: apibūdinimas <sup>(C, D)</sup>
<i>Cis</i> -kalamēnas	202,1722	1537	1525 <sup>[130]</sup>	1551,16±50,92	2,28±0,13	
<i>Trans</i> -kadina-1,4-dienas	204,1878	1539	1535 <sup>[111]</sup>	882,07±2,84	1,30±0,03	
NI <sup>III</sup>	202,1722	1540		429,11±0,00	0,63±0,01	
α-kadīnenas	204,1878	1546	1538 <sup>[111]</sup>	969,88±34,60	1,43±0,08	Medienos
<i>Trans</i> -α-bisabolēnas	204,1878	1549	1543 <sup>[3]</sup>	760,65±37,99	1,12±0,08	
NI <sup>III</sup>	204,1878	1553		1715,73±74,13	2,52±0,05	
NI <sup>III</sup>	202,1722	1556		233,81±111,01	0,35±0,17	
Selina-3,7(11)-dienas	204,1878	1558	1541 <sup>[111]</sup>	1171,02±130,12	1,72±0,23	
NI <sup>III</sup>	198,1409	1559		487,37±25,83	0,72±0,05	
NI <sup>III, IV</sup>	202,1722; 204,1878	1559		891,83±136,41	1,31±0,17	
α-kalakorenas	200,1565	1560	1546 <sup>[130]</sup>	853,54±8,77	1,26±0,04	Medienos
NI <sup>III, IV</sup>	202,1722; 204,1878	1570		95,22±17,57	0,14±0,03	
NI <sup>III</sup>	204,1878	1574		70,79±3,75	0,10±0,00	
NI <sup>III, IV</sup>	198,1409; 202,1722	1575		45,59±25,30	0,07±0,04	
NI <sup>III</sup>	200,1565	1577		48,55±6,07	0,07±0,01	
NI <sup>III, IV</sup>	202,1722; 204,1878	1579		70,79±3,75	0,11±0,01	
NI <sup>III</sup>	200,1565	1582		32,80±10,35	≤0,05	
NI <sup>III, IV</sup>	202,1722; 206,0943	1592		22,98±5,69	≤0,05	
NI <sup>III</sup>	202,1722	1625		24,05±8,69	≤0,05	

6 priedas. Tęsinys

Junginys	Tiksli masė	LSI <sub>apsk</sub>	LSI <sub>lit</sub>	DC smailės plotas x 10 <sup>6</sup>	Kiekis, %	Kvapo tipas: apibūdinimas (C, D)
NI <sup>III</sup>	200,1565	1630		104,59±20,39	0,15±0,03	
NI <sup>III</sup>	204,1878	1646		663,63±20,46	0,98±0,05	
NI <sup>III</sup>	204,1878	1655		184,25±6,91	0,27±0,02	
NI <sup>III</sup>	202,1722	1666		95,40±1,18	0,14±0,00	
NI <sup>III</sup>	204,1878	1672		997,20±24,65	1,47±0,07	
NI <sup>III</sup>	204,1878	1683		66,56±0,00	0,10±0,00	
Kadalenas	198,1409	1688	1688 <sup>[134]</sup>	34,01±4,06	≤0,05	
<b>Iš viso:</b>				<b>56590,51</b>	<b>83,16 %</b>	
<b>Oksiduoti seskviterpenai</b>						
NI <sup>V</sup>	222,1984	1502		252,08±6,58	0,37±0,02	
10,11-epoksi kalamėnėnas	216,1514	1505	1491 <sup>[131]</sup>	615,06±29,62	0,91±0,06	
Seskvicineolas	222,1984	1525	1512 <sup>[3]</sup>	981,21±139,49	1,44±0,17	
NI <sup>V</sup>	222,1984	1599		8,43±1,89	≤0,05	
τ-kadinolis	222,1984	1606	1636 <sup>[111]</sup>	107,34±3,04	0,16±0,00	Balzamiko: balzamiko, žemės, medienos
Kariofileno oksidas	220,1827	1614	1582 <sup>[21]</sup>	6,86±0,55	≤0,05	Medienos: saldus, gaivus, medienos, vaisių, pjuvenų, žolelių
NI <sup>V</sup>	222,1984	1620		25,64±5,13	≤0,05	
NI <sup>V</sup>	222,1984	1625		40,87±19,40	0,06±0,03	
Ledeno oksidas-(II)	220,1827	1627	1631 <sup>[133]</sup>	53,09±7,96	0,08±0,01	
Kubenolis	222,1984	1639	1645 <sup>[131]</sup>	151,98±23,42	0,22±0,04	Žemės, aštrus, žolelių, žaliosios arbatos
Cis-guaia-3,9-dien-11-olis	220,1827	1665	1652 <sup>[135]</sup>	221,44±46,34	0,33±0,08	
α-bisabololio oksidas B	238,1933	1666	1648 <sup>[111]</sup>	125,24±44,47	0,18±0,06	
α-eudesmolis	222,1984	1672	1652 <sup>[3]</sup>	1066,76±175,07	1,57±0,29	Saldus

## 6 priedas. Tęsinys

Junginys	Tikslī masė	LSI <sub>apsk</sub>	LSI <sub>lit</sub>	DC smailės plotas x 10 <sup>6</sup>	Kiekis, %	Kvapo tipas: apibūdinimas (C, D)
β-bisabololis	222,1984	1681	1672 <sup>[111]</sup>	448,29±149,22	0,66±0,23	Citrusų: citrusų, gėlių, aštrus, citrinų, gaivus, saldus, žolelių
Kuzinolas	220,1827	1689	1680 <sup>[131]</sup>	27,91±3,19	≤0,05	
α-bisabololis	222,1984	1698	1685 <sup>[111]</sup>	2866,48±477,98	4,22±0,80	Gėlių: švelnus gėlių, pipirų, balzamiko, saldus, vaško, apelsinų žievelės
Eudesm-7(11)-en-4-olis	222,1984	1714	1700 <sup>[131]</sup>	34,23±7,08	≤0,05	
Kriptomeridiolis	240,2089	1793	1809 <sup>[3]</sup>	4,46±0,78	≤0,05	
<b>Iš viso:</b>				<b>7037,37</b>	<b>10,36 %</b>	
<b>Alkoholiai</b>						
3-metil-1-butanolis	88,0888	767	760 <sup>[134]</sup>	3,86±1,05	≤0,05	Fermentuotas: fuzelio, viskio, vaisių, bananų
2-metil-2-buten-1-olis	86,0732	793	772 <sup>[136]</sup>	3,22±0,09	≤0,05	Žalias
Benzilo alkoholis	108,0575	1052	1046 <sup>[130]</sup>	44,58±6,81	0,07±0,01	Gėlių: gėlių, rožių, fenolio, balzamiko, saldus, vaisių
2-feniletanolis	122,0732	1128	1121 <sup>[130]</sup>	2,46±0,25	≤0,05	Gėlių: gėlių, rožių, saldus, aštrus, medaus, mielių, žolelių
Cinamilo alkoholis	134,0732	1328	1327 <sup>[137]</sup>	3,81±0,26	≤0,05	Balzamiko: saldus, balzamiko, hiacintų, aštrus
<b>Iš viso:</b>				<b>57,93</b>	<b>0,09 %</b>	
<b>Riebalų rūgštys</b>						
3-metilbutanoinė rūgštis	102,0681	843	843 <sup>[138]</sup>	6,82±0,45	≤0,05	Sūrio: nemalonus, prakaito, sūrio, pieno, aštrus, riebalų, vaisių
2-metilbutanoinė rūgštis	102,0681	852	839 <sup>[138]</sup>	4,07±0,00	≤0,05	Rūgštus: aštrus, rūgštus, sūrio, vaisių
2-metilbut-2-enoinė rūgštis	100,0524	925	942 <sup>[130]</sup>	8,95±0,11	≤0,05	Aštrus: saldus, aštrus, medienos, karamelės
Heksano rūgštis	116,0837	979	970 <sup>[138]</sup>	2,54±0,87	≤0,05	Riebalų: rūgštus, riebalų, prakaito, sūrio, aitrus
<b>Iš viso:</b>				<b>22,38</b>	<b>0,03 %</b>	
<b>Esteriai</b>						
Pentilo acetatas	130,0994	882	893 <sup>[139]</sup>	3,94±0,60	≤0,05	Vaisių: žolelių, vaisių, bananų, kriaušių, obuolių

## 6 priedas. Tęsinys

Junginys	Tikslī masė	LSI <sub>apsk</sub>	LSI <sub>lit</sub>	DC smailės plotas x 10 <sup>6</sup>	Kiekis, %	Kvapo tipas: apibūdinimas <sup>(C, D)</sup>
2-metilpropilo 3-metilbutanoatas	158,1307	1009	1013 <sup>[140]</sup>	3,92±0,72	≤0,05	Vaisių: saldus, vaisių, obuolių, aviečių, bananų
Izopentilo 2-metilbutanoatas	172,1463	1103	1101 <sup>[141]</sup>	7,54±2,44	≤0,05	Vaisių: saldus, vaisių, citrusų, vyšnių, mėlynių, obuolių
Benzilo acetatas	150,0681	1166	1170 <sup>[130]</sup>	24,08±3,97	≤0,05	Gėlių: saldus, gėlių, vaisių, gaivus, jazminų
Metil-4-metiloktanoatas	172,1463	1171	1187 <sup>[142]</sup>	5,29±0,14	≤0,05	
Etilo benzoatas	150,0681	1175	1171 <sup>[143]</sup>	5,98±1,74	≤0,05	Mėtinis: vaisių, pelėsių, saldus, žiemkenčių, vyšnių, vynuogių, ramunėlių, gėlių, arbatos
(E)-izopentil-2-metilbut-2-enoatas	170,1307	1186	1178 <sup>B</sup>	6,55±1,12	≤0,05	Gėlių: gėlių, vaisių, ramunėlių
Cis-3-heksenil-izovaleratas	184,1463	1201	1238 <sup>[144]</sup>	1,71±0,21	≤0,05	Žalias: gaivus, obuolių, vaisių, tropinis, ananasų
Metilo salicilatas	152,0473	1201	1195 <sup>[3]</sup>	1,40±0,06	≤0,05	Mėtinis: mėtinis, saldus, žiemkenčių, vyno, uogų
Metil-4,6-dimetiloktanoatas	186,1620	1277	1256 <sup>A</sup>	11,13±0,25	≤0,05	
Trans-linalolio oksido acetatas (piranoidinis)	212,1412	1284	1287 <sup>[131]</sup>	13,71±5,83	≤0,05	
Metil-4,8-dimetilnonanoatas	200,1776	1336	1336 <sup>[145]</sup>	2,24±0,10	≤0,05	
Metil-2-metoksibenzoatas	166,0630	1350	1342 <sup>[130]</sup>	3,21±0,45	≤0,05	Žolelių: žolelių, gėlių, hiacintų, vaisių, juodųjų serbentų
Metilo benzoilformatas	164,0473	1358	1335 <sup>[146]</sup>	3,25±2,78	≤0,05	
Etilo hidrocinamatas	178,0994	1360	1360 <sup>[147]</sup>	2,57±1,09	≤0,05	Gėlių: hiacintų, rožių, medaus, vaisių
Benzilo 2-metilbutanoatas	192,1150	1400	1392 <sup>[141]</sup>	7,79±2,10	≤0,05	
Benzilo 3-metilbutanoatas	192,1150	1409	1395 <sup>[141]</sup>	45,5±0,00	0,07±0,00	Vaisių: saldus, vaisių, obuolių, ananasų, žolelių
Etilo cinamatas	176,0837	1462	1463 <sup>[21]</sup>	2,64±0,06	≤0,05	Balzamiko: saldus, balzamiko, vaisių, aštrus, uogų, slyvų
Prenilo benzoatas	190,0994	1504	1486 <sup>[131]</sup>	319,09±9,26	0,47±0,02	Balzamiko: balzamiko, vaisių, šokolado
Benzilo benzoatas	212,0837	1787	1762 <sup>[3]</sup>	14,18±8,20	≤0,05	Balzamiko: saldus, balzaminis, žolelių
Benzilo salicilatas	228,0786	1890	1865 <sup>[3]</sup>	16,00±0,44	≤0,05	Balzamiko: balzamiko, žolelių, saldus
<b>Iš viso:</b>				<b>501,72</b>	<b>0,74 %</b>	

## 6 priedas. Tęsinys

Junginys	Tiksli masė	LSI <sub>apsk</sub>	LSI <sub>lit</sub>	DC smailės plotas x 10 <sup>6</sup>	Kiekis, %	Kvapo tipas: apibūdinimas <sup>(C, D)</sup>
<b>Ketonai</b>						
Acetofenonas	120,0575	1086	1073 <sup>[130]</sup>	15,85±5,45	≤0,05	Gėlių: saldus, aitrus, gudobelių, mimozos, migdolų, akacijų
Benzilacetonas	148,0888	1255	1234 <sup>[148]</sup>	13,93±3,34	≤0,05	Gėlių: gėlių, balzamo
4-metoksiacetofenonas	150,0681	1376	1350 <sup>[131]</sup>	2,41±0,34	≤0,05	Anyžinis: saldus, gudobelių, anyžinis, akacijų, vanilės, vyšnių
<b>Iš viso:</b>				<b>32,19</b>	<b>0,05 %</b>	
<b>Kiti</b>						
Dihidrofuran-2(3H)-onas	86,0368	937	938 <sup>[149]</sup>	1,14±0,36	≤0,05	Creamy: creamy, riebalų, karamelės
Benzaldehidas	106,0419	984	968 <sup>[147]</sup>	1,61±0,83	≤0,05	Vaisių: saldus, migdolų, vyšnių, vaisių, deginto cukraus, medienos
o-metilanizolas	122,0732	1022	1013 <sup>[150]</sup>	4,63±0,43	≤0,05	Naftaleno: saldus, riešutų, gėlių
NI	193,9341	1044		1,71±0,56	≤0,05	
1,2-dimetoksibenzenas	138,0681	1150	1149 <sup>[151]</sup>	3,27±0,59	≤0,05	Vanilės: saldus, vanilės
NI	312,3028	1153		16,02±0,73	≤0,05	
NI <sup>IV</sup>	182,1307; 168,1150; 84,0575	1234		14,45±0,05	≤0,05	
3,9-dodekadienas	162,1409	1259	1249 <sup>A</sup>	10,49±0,63	≤0,05	
NI	190,1358	1383		606,87±118,27	0,89±0,19	
NI	158,1096	1403		186,32±134,95	0,27±0,19	
NI	111,0684	1412		62,76±5,67	0,09±0,01	
NI	158,1096	1412		64,49±5,79	0,10±0,01	
2,6-dimetilnaftalenas	156,0939	1445	1409 <sup>[152]</sup>	59,75±1,14	0,09±0,00	
NI <sup>II</sup>	158,1096	1513		776,62±0,00	1,14±0,03	

## 6 priedas. Tęsinys

Junginys	Tiksli masė	LSI <sub>apsk</sub>	LSI <sub>lit</sub>	DC smailės plotas x 10 <sup>6</sup>	Kiekis, %	Kvapo tipas: apibūdinimas <sup>(C, D)</sup>
NI	190,1358	1538		451,25±0,00	0,66±0,02	
NI	264,2089	1643		43,93±2,11	0,07±0,01	
NI	196,1252	1647		552,26±0,00	0,81±0,02	
NI <sup>IV</sup>	190,1358; 422,1260	1649		363,776±30,83	0,54±0,06	
NI	258,1984	1688		35,96±3,85	≤0,05	
<b>Iš viso:</b>				<b>3257,306</b>	<b>4,79 %</b>	
<b>Bendras DC smailių plotas x 10<sup>6</sup>: 68049,46±1525,79</b>						

LSI – linijinis sulaikymo indeksas; NI – neidentifikuota; A – chemspider.com; B – pubchem.ncbi.nlm.nih.gov; C – thegoodscentscompany.com; D – pherobase.com; I – angliavandeniliniai monoterpenai; II – oksiduoti monoterpenai; III – angliavandenilinių seskviterpenai; IV – junginių mišinys; V – oksiduoti seskviterpenai; [130–152] – LSI<sub>lit</sub> nurodyti literatūros sąrašė