



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Немања Станковић

***IN VITRO* КОНТРОЛА ПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА ПОРЕКЛОМ ИЗ ХУМАНОГ
МАТЕРИЈАЛА ДЕЛОВАЊЕМ ЕТАРСКИХ УЉА И ЕКСТРАКАТА
ОДАБРАНИХ БИЉНИХ ВРСТА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2016

I. Аутор
Име и презиме: Немања Станковић
Датум и место рођења: 8.5.1970. Ниш
Садашње запослење: Институт за јавно здравље Ниш, Лабораторија за санитарну микробиологију
II. Докторска дисертација
Наслов: <i>In vitro</i> контрола патогених бактерија пореклом из хуманог материјала деловањем етарских уља и екстраката одабраних биљних врста
Број страница: 176
Број слика: слика-8, табела-17, графика-33
Број библиографских података: 210
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет у Нишу, Институт за јавно здравље Ниш
Научна област (УДК): Биологија/Микробиологија
Ментор: проф. др Татјана Михајлов-Крстев
III. Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 18.11.2015.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
1. др Љиљана Чомић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија (председник комисије); 2. др Татјана Михајлов-Крстев, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Биотехнологија; 3. др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Микробиологија
Комисија за оцену докторске дисертације:
1. др Љиљана Чомић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија (председник комисије); 2. др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Микробиологија; 3. др Бојан Златковић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Ботаника; 4. др Весна Станков-Јовановић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Аналитичка хемија
Комисија за одбрану докторске дисертације:
1. др Љиљана Чомић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија (председник комисије); 2. др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Микробиологија; 3. др Бојан Златковић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Ботаника; 4. др Весна Станков-Јовановић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Аналитичка хемија
Датум одбране дисертације:

Захвалница

Израда ове докторске дисертације је омогућена захваљујући експерименталном раду у следећим институцијама: Лабораторије Катедре за аналитичку хемију и Катедре за органску хемију и биохемију Департмана за хемију Природно-математичког факултета у Нишу, Лабораторија за микробиологију Катедре за експерименталну биологију и биотехнологију Департмана за биологију у екологију Природно-математичког факултета у Нишу, Лабораторија за пио културе и Лабораторија за санитарну микробиологију Института за јавно здравље у Нишу.

Велику захвалност дугујем ментору, проф. др Татјани Михајлов-Крстев, на свеукупном залагању, пруженом знању и саветима, подрици и стрпљењу у току израде докторске дисертације и научних радова.

Захвалност дугујем проф. др Љиљани Чомић, на одличној сарадњи, правовременим стручним саветима и исказаној предусретљивости.

Проф. др Бранислави Коцић хвала на колегијалности, стручној помоћи и сарадњи.

Проф. др Весни Станков-Јовановић, доц. др Јелени Матејић и проф. др Бојану Златковићу хвала на лепој сарадњи, залагању, корисним саветима и пријатељској помоћи.

Хвала мојом колегама из Лабораторија за санитарну микробиологију и пио културе, др Анђелки Светозаревић-Николић, др Љиљани Кривокапић, др Снежани Младеновић и др Зорану Богојевићу, као и техничком и помоћном особљу Лабораторија, на колегијалности и подрици.

Захваљујем се мојој породици на константној безрезервној подрици, посебно мојој мајци Анђелки и супризи Ани, као и мојој деци, Тари и Арсенију који су ми током целог процеса докторских студија и израде докторске дисертације били главни ослонац у свим тежким тренуцима и који су увек веровали у мене.

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

AAE – еквивалент аскорбинске киселине
ABTS – 2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)
BHA – 3-терц-бутил-4-хидроксианизол
BHT – бутиловани хидрокситолуен
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute protocol (Протокол Института за клиничке и лабораторијске стандарде)
DE - dry extract (суви екстракт)
ДМСО – диметил сулфоксид
DPPH – 2,2-дифенил, 1-пикрил хидразил
FIC - fractional inhibitory concentration (фракциона инхибиторна концентрација)
FID - (flame ionisation detector) – пламено јонизујући детектор
FRAP - (Ferric reducing antioxidant power) тест
GA – гална киселина
ГХ – гасна хроматографија
ГХ-МС – гасна хроматографија са спектрометријом маса
HIV- human immunodeficiency virus (људски имунодефицијентни вирус)
IC₅₀ – концентрација антиоксиданса која редукује стварање слободних радикала за 50%
MeOH – метанол
MBC – minimum bactericidal concentration (минимална бактерицидна концентрација)
McFarland standard – стандард за одређивање густине бактеријске суспензије
МНА - Милер Хинтон агар
MIC – minimum inhibitory concentration (минимална инхибиторна концентрација)
МРСА – метицилин резистентан *Staphylococcus aureus*
МС – масена спектрометрија
ПАБА - Парааминобензоинска киселина
PBP – peniciline binding proteins
RE - еквивалент рутина
R_i – ретенциони индекс експериментално одређен
R_l – ретенциони индекс литературни податак
SC₅₀ – концентрација која инхибира формирање радикала за 50%
TE – еквивалент тролюкса
Trolox - (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина)
TRP – (total reducing power) метода
TSA – триптиказа соја агар
TTC - трифенил тетразолиум хлорид
Vitamin C, (Vit C) – аскорбинска киселина

ЛИСТА ТАБЕЛА:

Табела 4-1. Информације о сакупљеном и испитиваном биљном материјалу	62
Табела 5-1. Принос етарских уља и метанолних екстраката испитиваних биљаних врста	74
Табела 5-2. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Achillea grandifolia</i>	76
Табела 5-3. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Achillea crithmifolia</i>	78
Табела 5-4. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Angelica pancicii</i>	80
Табела 5-5. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Angelica sylvestris</i>	82
Табела 5-6. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Artemisia absinthium</i>	84
Табела 5-7. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Hyssopus officinalis</i>	87
Табела 5-8. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Laserpitium latifolium</i>	89
Табела 5-9. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Tanacetum parthenium</i>	91
Табела 5-10. Антиоксидативна активност етарских уља различитих биљних врста добијена применом DPPH и ABTS метода	94
Табела 5-11. Минималне инхибиторне и бактерицидне концентрација референтних антибиотика (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала	97
Табела 5-12. Антибактеријска активност етарских уља биљаних врста фамилија Ариасеае и Ламиасеае (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала	99
Табела 5-13. Антибактеријска активност етарских уља биљних врста фамилије Астерасеае (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала	100
Табела 5-14. Антиоксидативне карактеристике метанолних екстраката биљних врста <i>T. parthenium</i> , <i>A. grandifolia</i> , <i>A. crithmifolia</i> , <i>A. absinthium</i> , <i>L. latifolium</i> , <i>A. pancicii</i> , <i>A. sylvestris</i> и <i>H. Officinalis</i>	123
Табела 5-15. Антибактеријска активност метанолних екстраката биљних врста из фамилија Ариасеае и Ламиасеа (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала. Различита слова означавају значајне разлике на $p < 0,05$ – Тукеј тест	130
Табела 5-16. Антибактеријска активност метанолних екстраката биљних врста из фамилије Астерасеае (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала. Различита слова означавају значајне разлике на $p < 0,05$ – Тукеј тест	131

ЛИСТА ГРАФИКА:

График 5-1. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте <i>A. grandifolia</i>	77
График 5-2. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте <i>A. crithmifolia</i>	79
График 5-3. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте <i>A. panicii</i>	81
График 5-4. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте <i>A. sylvestris</i>	83
График 5-5. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте <i>A. absinthium</i>	85
График 5-6. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте <i>H. officinalis</i>	88
График 5-7. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте <i>L. latifolium</i>	90
График 5-8. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте <i>T. parthenium</i>	92
График 5-9. Заступљеност доминантних компоненти у анализираним етарским уљима	93
График 5-10. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте <i>Angelica sylvestris</i> и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1- <i>Staphylococcus aureus</i> , 2- <i>Streptococcus pyogenes</i> , 3- <i>Enterococcus faecalis</i> , 4- <i>Escherichia coli</i> , 5- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 6- <i>Acinetobacter</i> sp., 7- <i>Proteus mirabilis</i> , 8- <i>Klebsiella</i> sp.	101
График 5-11. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте <i>Angelica sylvestris</i> и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1- <i>Streptococcus pneumoniae</i> , 2- <i>Staphylococcus aureus</i> ; брисева грла: 3- <i>Streptococcus pyogenes</i> , 4- <i>Escherichia coli</i> ; спутума 5- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1), 6- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2), 7- <i>Klebsiella</i> sp. и аспирата: 8- <i>Escherichia coli</i> ...	102
График 5-12. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте <i>Angelica panicii</i> и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1- <i>Staphylococcus aureus</i> , 2- <i>Streptococcus pyogenes</i> , 3- <i>Enterococcus faecalis</i> , 4- <i>Escherichia coli</i> , 5- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 6- <i>Acinetobacter</i> sp., 7- <i>Proteus mirabilis</i> , 8- <i>Klebsiella</i> sp.	103
График 5-13. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте <i>Angelica panicii</i> и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1- <i>Streptococcus pneumoniae</i> , 2- <i>Staphylococcus aureus</i> ; брисева грла: 3- <i>Streptococcus pyogenes</i> , 4- <i>Escherichia coli</i> ; спутума 5- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1), 6- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2), 7- <i>Klebsiella</i> sp. и аспирата: 8- <i>Escherichia coli</i>	103
График 5-14. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте <i>Artemisia absinthium</i> и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1- <i>Staphylococcus aureus</i> , 2- <i>Streptococcus pyogenes</i> , 3- <i>Enterococcus faecalis</i> , 4- <i>Escherichia coli</i> , 5- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 6- <i>Acinetobacter</i> sp., 7- <i>Proteus mirabilis</i> , 8- <i>Klebsiella</i> sp.	105
График 5-15. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте <i>Artemisia absinthium</i> и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1- <i>Streptococcus pneumoniae</i> , 2- <i>Staphylococcus aureus</i> ; брисева грла: 3- <i>Streptococcus pyogenes</i> , 4- <i>Escherichia coli</i> ; спутума: 5- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1), 6- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2), 7- <i>Klebsiella</i> sp. и аспирата: 8- <i>Escherichia coli</i>	106

- График 5-16.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Achillea crithmifolia* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp. 107
- График 5-17.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Achillea crithmifolia* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспирата: 8-*Escherichia coli* 108
- График 5-18.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Achillea grandifolia* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp. 109
- График 5-19.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Achillea grandifolia* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспирата: 8-*Escherichia coli* 109
- График 5-20.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Tanacetum parthenium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp. 110
- График 5-21.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Tanacetum parthenium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспирата: 8-*Escherichia coli* 111
- График 5-22.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Hyssopus officinalis* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp. 112
- График 5-23.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Hyssopus officinalis* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспирата: 8-*Escherichia coli* 113
- График 5-24.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Laserpitium latifolium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp. 115

- График 5-25.** Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Laserpitium latifolium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспирата: 8-*Escherichia coli* 115
- График 5-26.** Синергистичко деловање етарског уља *A. sylvestris* са еритромицином у односу на изабране бактеријске сојеве. (1) *Acinetobacter* sp. (брис ране); (2) *P. mirabilis* (брис ране); (3) *Klebsiella* sp. (брис ране); (4) *P. aeruginosa* 1 (спутум) и (5) *P. aeruginosa* 2 (спутим). FIC – фракциона инхибиторна концентрација. SD= ± 0,02 120
- График 5-27.** Синергистичко деловање етарског уља *A. panicii* са еритромицином у односу на изабране бактеријске сојеве. (1) *S.aureus* (брис ране); (2) *S. pyogenes* (брис ране); (3) *E. faecalis* (брис ране); (4) *Acinetobacter* sp. (брис ране) и (5) *S. aureus* (брис носа). FIC – фракциона инхибиторна концентрација. SD= ± 0,02 121
- График 5-28.** Антиоксидантне карактеристике метанолних екстраката испитиваних биљних врста: DPPH; TRP (изражен као еквивалент аскорбинске киселине у милиграмима по граму сувог екстракта); FRAP (изражен као mmol Fe²⁺ по граму сувог екстракта); ABTS (изражен као еквивалент mmol тролокса по граму сувог екстракта). Резултати су добијени израчунавањем средње вредности три понављања±стандардна девијација 124
- График 5-29.** Садржај укупних флавоноида и укупних полифенола у метанолним екстрактима испитиваних биљних врста. Резултати су добијени израчунавањем средње вредности три понављања±стандардна девијација 125
- График 5-30.** Антибактеријско деловање етарских уља биљних врста *A. panicii*, *A. sylvestris* и *A. absinthium* против соја *Acinetobacter* sp. изолованог из бриса ране у поређењу са референтним антибиотцима 138
- График 5-31.** Антибактеријско деловање етарског уља врсте *A. sylvestris* и соја *P. aeruginosa* изолованог из спутима у поређењу са референтним антибиотцима 138
- График 5-32.** Антибактеријско деловање етарског уља врсте *A. sylvestris* и соја *P. mirabilis* изолованог из бриса ране у поређењу са референтним антибиотцима 139
- График 5-33.** Антибактеријско деловање етарског уља врсте *A. sylvestris* и соја *Klebsiella* sp. изолованог из бриса ране у поређењу са референтним антибиотцима 139

ЛИСТА СЛИКА:

Слика 2-1. <i>Angelica sylvestris</i> L.	34
Слика 2-2. <i>Angelica pancicii</i> Vand.	36
Слика 2-3. <i>Laserpitium latifolium</i> L.	38
Слика 2-4. <i>Hyssopus officinalis</i> L.	42
Слика 2-5. <i>Artemisia abinthium</i> L.	45
Слика 2-6. <i>Achillea grandifolia</i> Friv.	47
Слика 2-7. <i>Achillea crithmifolia</i> W.K..	49
Слика 2-8. <i>Tanacetum parthenium</i> (L). Shulz. Bip.	52

**IN VITRO КОНТРОЛА ПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА ПОРЕКЛОМ ИЗ ХУМАНОГ
МАТЕРИЈАЛА ДЕЛОВАЊЕМ ЕТАРСКИХ УЉА И ЕКСТРАКАТА
ОДАБРАНИХ БИЉНИХ ВРСТА**

Резиме

Увод. Последњих деценија један од водећих проблема у медицини је стварање резистентности патогених микроорганизама на деловање антибиотика. Бактерије које показују значајну резистентност на постојеће антибиотике су: метицилин резистентни *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., итд. Приликом деловања на патогене бактерије, антибиотици неселективно утичу и на непатогене бактерије, изазивајући при том непредвидиве генетске промене. Поред корисних ефеката у деловању на бактерије, расположиви антибиотици, такође могу проузроковати нежељене ефекте као што су хиперсензитивност и имуносупресија. То је разлог због кога се трага за новим агенсима са антибиотским деловањем. Један од природних извора таквих агенаса су етарска уља и екстракти ароматичних биљака који се користе у традиционалној медицини за лечење многих инфективних болести и болести које настају као последица оксидативног стреса. Због тога је циљ истраживања ове дисертације био да се изврши компаративна анализа хемијског састава, антибактеријске и антиоксидативне активности одабраних биљних врста *Angelica panicii*, *Angelica sylvestris*, *Laserpitium latifolium*, *Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Artemisia absinthium*, *Tanacetum parthenium* и *Hyssopus officinalis* које су веома заступљене у традиционалној медицини.

Материјал и методе. Биљни материјал који је коришћен у овом истраживању је прикупљан током 2012. и 2013. године на територији југоисточне Србије. Након сушења биљног материјала, приступило се процесу изоловања етарских уља методом хидродестилације у апаратури по Клевинџеру, као и припремању метанолних екстраката алкохолном екстракцијом. Хемијски састав уља је анализиран помоћу ГХ (гасна хроматографија) и ГХ/МС (гасна хроматографија са спектрометријом маса) метода. Укупни феноли су одређивани методом по Фолин-Сјоклто-у, са малим модификацијама, а укупни флавоноиди су утврђивани коришћењем алуминијум хлорид ($AlCl_3$) колориметријског метода. Антиоксидативна активност етарских уља и екстраката је одређивана помоћу ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина), DPPH (2,2-дифенил, 1-пикрил хидразил), TRP (total reducing

power) и FRAP (Ferric reducing antioxidant power) метода. Антибактеријска активност изолованих етарских уља, метанолних екстраката и четири антибиотика (ципрофлоксацин, доксициклин, гентамицин и еритромицин) је испитивана микродилуционом методом против 16 бактеријских сојева пореклом из брисева рана, грла и носа, спутума и аспирата пацијената (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*). Синергистичко деловање најактивнијих уља и антибиотика са најслабијим деловањем, еритромицином, у циљу снижавања његових активних концентрација, је одређивно уз помоћ методе шаховске табле тј. „checkerboard“ методом.

Резултати. Приноси етарских уља испитиваних биљних врста су се кретали од 0,05% (код *Angelica sylvestris*) до 0,6% (код *Tanacetum parthenium*), док су приноси метанолних екстраката били у опсегу од 4,7% (за *Achillea crithmifolia*) до 10,1% (за *Artemisia absinthium*). Као доминантне компоненте у етарским уљима идентификоване су: код *A. crithmifolia* артемизија кетон 31,7%, камфор 25,4% и 1,8 – цинеол 14,8%, код *A. grandifolia* камфор 45,4%, 1,8-цинеол 16,4% и α -тујон 15,1%, код *A. absinthium* сабинен 21,5%, орто-цимен 19,2% и (з)-епокси-оцимен 11,0%, код *H. officinalis* 1,8-цинеол 49,1% и изопинокамфона 22,7%, код *L. latifolium* сабинен 47,8% и α -пинен 25,0%, код *T. parthenium* камфор 51,4%, транс-хризантенил ацетат 22,7%, камфен 7,3%, код *A. sylvestris* лимонен 75,3% и α -пинен 9,6%, и код *A. panicii* β -феландрен 54,9%, α -пинен 4,5% и α -феландрен 4,0%. Антибактеријско деловање испитиваних уља се кретало у оквиру тестираних концентрација од 0,10 до 93,20 mg/mL. Најјаче антибактеријско деловање показала су етарска уља биљних врста *A. sylvestris* и *A. panicii*. Минималне инхибиторне и бактерицидне концентрације ових уља кретале су се у опсегу од MIC=MBC=0,11/54,40 mg/mL (за *A. sylvestris*) и MIC=MBC=0,10/48,20 mg/mL (за *A. panicii*). Етарска уља *A. sylvestris* и *A. panicii* су показала најизраженије деловање против соја *Acinetobacter* sp. (MIC/MBC=0,11/0,22 mg/mL, за *A. sylvestris*) и (MIC=MBC=0,10 mg/mL, за *A. panicii*). Синергистичко деловање етарских уља биљних врста *Angelica sylvestris* и *Angelica panicii* са антибиотиком еритромицином је довело до смањења MIC вредности за еритромицин. Антибактеријска активност метанолних екстраката се кретала у распону од 6,25–100,00 mg/mL за MIC вредности до 12,50–100,00 mg/mL (>100,00 mg/mL) за MBC вредности. Најизраженију антиоксидативну активност показало је етарско уље врсте *Achillea grandifolia*

[33,57±0,07 IC₅₀(mg/mL)-DPPH тест и 2,51±0,04 mg VitC/g-ABTS тест], а најнижу етарско уље врсте *Hyssopus officinalis* [354,28±0,01 IC₅₀(mg/mL)-DPPH тест и 0,09±0,01 mg VitC/g-ABTS тест]. Метанолни екстракт врсте *A. crithmifolia* је показао најјачу антиоксидативну активност [91,40±0,80% (DPPH тест) 78,55±0,80 mgAAE/g сувог екстракта (TRP метода), 0,76±0,80 mmol Fe/g сувог екстракта (FRAP метода), 0,59±0,00 mmol TE/g сувог екстракта (ABTS тест), 97,70±1,00 mgRE/g сувог екстракта (укупни флавоноиди), 172,90±1,20 mgGA/g сувог екстракта (укупни полифеноли)], а најслабију екстракт биљне врсте *A. sylvestris* [35,75±0,30% (DPPH тест), 17,74±0,20 mgAAE/g сувог екстракта (TRP метода), 0,17±0,00 mmol Fe/g сувог екстракта (FRAP метода), 0,11±0,00 mmol TE/g сувог екстракта (ABTS тест), 27,46±0,20 mgRE/g сувог екстракта (укупни флавоноиди), 49,64±0,4 mgGA/g сувог екстракта (укупни полифеноли)].

Закључак. У овој докторској дисертацији су по први пут представљени подаци о антибактеријској активности етарских уља биљних врста *A. sylvestris*, *A. pancicii* и *A. grandifolia*, као и метанолних екстракта *A. pancicii*, *A. grandifolia*, *L. latifolium* и *T. parthenium*. Такође, први пут су изнети подаци и о антиоксидативној активности етарских уља биљних врста *A. sylvestris*, *A. pancicii*, *L. latifolium*, *A. crithmifolia* и *T. parthenium*, као и метанолних екстракта *A. pancicii*, *A. sylvestris*, *A. grandifolia*, *A. crithmifolia* и *H. officinalis*. Испитиване биљне врсте поседују значајан антимикуробни и антиоксидативни потенцијал и природни су извор биоактивних једињења. Будућа истраживања требала би требало да се крећу у правцу изоловања чистих доминантних компоненти и утврђивања њиховог антимикуробног и синергистичког деловања у циљу откривања нових антимикуробних агенаса и превазилажења проблема мултирезистентности патогених бактерија на актуелне антибиотике. У светлу тих резултата се може разматрати и могућност дизајнирања фармаколошких препарата, нарочито када су у питању кожног инфекције.

IN VITRO CONTROL OF PATHOGENIC BACTERIA FROM HUMAN MATERIAL BY ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS OF CERTAIN PLANT SPECIES

Abstract

Introduction. During the last several decades one of the leading challenges in medicine is appearance of resistance of pathogenic microorganisms to antibiotic activity. Bacteria showing significant resistance on existing antibiotics include: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., etc. During the activity on pathogenic bacteria, the antibiotics simultaneously show non-selective impact on nonpathogenic bacteria, causing unpredictable genetic changes. In addition to beneficial effects on bacteria, the available antibiotics may also cause adverse effects such as hypersensitivity and immunosuppression. Therefore studies of new agents with antibiotic activity are constantly ongoing. One of the natural sources of such agents are essential oils and extracts of aromatic plants used in traditional medicine as a cure for many infectious diseases and ailments caused by oxidative stress. Therefore the goal of study presented in this dissertation was comparative analysis of chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of eight chosen plant species regularly represented in traditional medicine: *Angelica panicii*, *Angelica sylvestris*, *Laserpitium latifolium*, *Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Artemisia absinthium*, *Tanacetum parthenium* and *Hyssopus officinalis*.

Material and methods. The plant material used in this study was collected in 2012 and 2013 in southeastern Serbia. After the plant material was dried, essential oils were isolated by hydro-distillation method using the Clevenger apparatus, while methanol extracts were prepared by alcoholic extraction. The chemical composition of oil was analyzed by GC (gas chromatography) and GC/MS (gas chromatography with mass spectrometry) methods. The total amount of phenols was determined by Folin-Ciocalteu method with slight modifications, while total flavonoids were determined by aluminum chloride (AlCl_3) colorimetric method. The antioxidant activity of essential oils and extracts was determined by ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TRP (total reducing power) and FRAP (Ferric reducing antioxidant power) methods. The antibacterial activity of isolated essential oils, methanol extracts and four antibiotics (ciprofloxacin, doxycycline, gentamicin and erythromycin) was studied by micro-dilution method against 16 bacterial strains collected from swabs of wounds, throat, nose, sputum and aspirate of patients (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus*

mirabilis, *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*). The synergistic activity of most active oils and the lowest-activity antibiotic (erythromycin), in order to decrease its active concentrations, was determined by the so-called “checkerboard” method.

Results. The yield of essential oils in studied plant species ranged from 0.05% (in *Angelica sylvestris*) to 0.6% (in *Tanacetum parthenium*), while yields of methanol extracts ranged from 4.7 (in *Achillea crithmifolia*) to 10.1% (in *Artemisia absinthium*). Following components were identified as dominant in essential oils: in *A. crithmifolia* artemisia ketone 31.7%, camphor 25.4% and 1,8-cineol 14.8%; in *A. grandifolia* camphor 45.4%, 1,8-cineol 16.4% and α -thujone 15.1%; in *A. absinthium* sabinene 21.5%, ortho-cymene 19.2% and (z)-epoxyocimene 11.0%; in *H. officinalis* 1,8-cineol 49.1% and isopinocampone 22.7%; in *L. latifolium* sabinene 47.8% and α -pinene 25.0%; in *T. parthenium* camphor 51.4%, trans-chrysantenil acetate 22.7%, camphene 7.3%; in *A. sylvestris* limonene 75.3% and α -pinene 9.6%; and in *A. panicii* β -phelandrene 54.9%, α -pinene 4.5% and α -phelandrene 4.0%. The antibacterial activity of studied oils was studied in concentrations ranging from 0.10 to 93.20 mg/mL. The strongest antibacterial activity was recorded in essential oils of plant species *A. sylvestris* and *A. panicii*. The range of minimal inhibitory and bactericidal concentrations of these oils was MIC=MBC=0.11/54.40 mg/mL (in *A. sylvestris*) and MIC=MBC=0.10/48.20 mg/mL (in *A. panicii*). The essential oils of *A. sylvestris* and *A. panicii* have shown the most pronounced activity against the strain *Acinetobacter* sp. (MIC/MBC=0.11/0.22 mg/mL, in *A. sylvestris*) and (MIC=MBC=0.10 mg/mL, in *A. panicii*). Synergistic activity of essential oils from species *Angelica sylvestris* and *Angelica panicii* with erythromycin antibiotic led to decrease of MIC values for the erythromycin. The antibacterial activity of methanol extracts ranged from 6.25–100.00 mg/mL for MIC values to 12.50–100.00 mg/mL (>100.00 mg/mL) for MBC values. The most pronounced antioxidant activity was recorded for essential oil of species *Achillea grandifolia* [33.57 ± 0.07 IC₅₀(mg/mL)-DPPH test and 2.51 ± 0.04 mg VitC/g-ABTS test], while the lowest activity was recorded for essential oil of species *Hyssopus officinalis* [354.28 ± 0.01 IC₅₀(mg/mL)-DPPH test and 0.09 ± 0.01 mg VitC/g-ABTS test]. The methanol extract of species *A. crithmifolia* has shown the strongest antioxidant activity [$91.40 \pm 0.80\%$ (DPPH test), 78.55 ± 0.80 mgAAE/g of dry extract (TRP method), 0.76 ± 0.80 mmol Fe/g of dry extract (FRAP method), 0.59 ± 0.00 mmol TE/g of dry extract (ABTS test), 97.70 ± 1.00 mgRE/g of dry extract (total flavonoids), 172.90 ± 1.20 mgGA/g of dry extract (total polyphenols)], while the lowest antioxidant activity was

recorded for extract of plant species *A. sylvestris* [$35.75 \pm 0.30\%$ (DPPH test), 17.74 ± 0.20 mgAAE/g of dry extract (TRP method), 0.17 ± 0.00 mmol Fe/g of dry extract (FRAP method), 0.11 ± 0.00 mmol TE/g of dry extract (ABTS test), 27.46 ± 0.20 mgRE/g of dry extract (total flavonoids), 49.64 ± 0.4 mgGA/g of dry extract (total polyphenols)].

Conclusion. This Doctoral Thesis presents the first original data on antibacterial activity of essential oils from plant species *A. sylvestris*, *A. pancicii* and *A. grandifolia*, as well as methanol extracts of *A. pancicii*, *A. grandifolia*, *L. latifolium* and *T. parthenium*. The paper also includes the first published data on antioxidant activity of essential oils collected from plant species *A. sylvestris*, *A. pancicii*, *L. latifolium*, *A. crithmifolia* and *T. parthenium*, as well as methanol extracts of *A. pancicii*, *A. sylvestris*, *A. grandifolia*, *A. crithmifolia* and *H. officinalis*. Studied plant species have significant antimicrobial and antioxidant potential as a natural source of bioactive compounds. The future studies should be directed toward isolation of pure dominant components and determination of their antimicrobial and synergistic activity, with the goal of discovering new antimicrobial agents and overcoming the challenges of pathogenic bacteria with multi-resistance to presently used antibiotics. In light of these results it is also possible to discuss the possibility of designing the pharmacological preparates, particularly in case of skin infections.

САДРЖАЈ:

1. УВОД	1
2. ОПШТИ ДЕО И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	5
2.1. Инфективне болести, патогеност и патогени микроорганизми	5
2.2. Опис изабраних патогених микроорганизма	6
2.3. Механизми деловања антибиотика на патогене микроорганизме	19
2.4. Резистенција патогених микроорганизма	27
2.5. Биљке као потенцијални извор биоактивних супстанци	30
2.6. Опште карактеристике одабраних биљних врста	33
2.6.1. Опште карактеристике врсте <i>Angelica sylvestris</i> L. (Fam. Apiaceae)	33
2.6.2. Опште карактеристике врсте <i>Angelica panicii</i> Vand. (Fam. Apiaceae)	35
2.6.3. Опште карактеристике врсте <i>Laserpitium latifolium</i> L. (Fam. Apiaceae)	36
2.6.4. Опште карактеристике врсте <i>Hyssopus officinalis</i> L. (Fam. Lamiaceae)	39
2.6.5. Опште карактеристике врсте <i>Artemisia abinthium</i> L. (Fam. Asteraceae)	42
2.6.6. Опште карактеристике врсте <i>Achillea grandifolia</i> Friv. (Fam. Asteraceae)	45
2.6.7. Опште карактеристике врсте <i>Achillea crithmifolia</i> W.K. (Fam. Asteraceae)	47
2.6.8. Опште карактеристике врсте <i>Tanacetum parthenium</i> L. Shulz. Bip. (Fam. Asteraceae)	49
2.7. Секундарни метаболити биљака	52
2.8. Механизам деловања етарских уља и екстраката на патогене микроорганизме	57
3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	59
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	60
I. МАТЕРИЈАЛ	60
4.1. Раствори и реагенси	60
4.2. Биљни материјал	61
4.2.1. Сакупљање и детерминација биљног материјала	61
4.2.2. Изоловање етарског уља из биљног материјала	62
4.2.3. Припрема метанолних екстраката	62
4.3. Бактеријски сојеви	63
4.3.1. Изолација и идентификација бактеријских сојева из хуманог материјала	63
4.3.2. Стандардна антибиограм метода	64
II. МЕТОДЕ	65
4.4. Хемијска анализа етарских уља	65
4.4.1. Гасна хроматографија (ГХ) и гасна хроматографија/масена спектрометрија (ГХ/МС)	65
4.4.1.2. Идентификација компоненти	66
4.5. Методе за утврђивање антиоксидативне активности етарских уља и метанолних екстраката	66
4.5.1. Методе за утврђивање антиоксидативне активности етарских уља	66
4.5.1.1. DPPH (2,2-дифенил, 1-пикрил хидразил) тест	66

4.5.1.2. ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) тест	67
4.5.2. Методе за утврђивање антиоксидативне активности метанолних екстраката	67
4.5.2.1. Одређивање укупних фенола	68
4.5.2.2. Одређивање укупних флавоноида	68
4.5.2.3. DPPH (2,2-дифенил, 1-пикрил хидразил) тест	68
4.5.2.4. ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) тест	69
4.5.2.5. TRP (total reducing power)- одређивање укупне редукционе моћи	69
4.5.2.6. FRAP (Ferric reducing antioxidant power) тест-Редукциона антиоксидативна моћ према Fe	70
4.6. Методе за испитивање антимикуробне активности	70
4.6.1. Микродилуциона метода за испитивање етарских уља	70
4.6.2. Микродилуциона метода шаховске табле „Checkerboard“ метода	71
4.6.3. Микродилуциона метода за испитивање метанолних екстраката	72
4.7. Статистичка обрада података	73
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	74
5.1. <i>In vitro</i> контрола патогених бактерија пореклом из хуманог материјала деловањем етарских уља	75
5.1.1. Компаративна анализа хемијског састава етарских уља одабраних биљних врста	75
5.1.1.1. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Achillea grandifolia</i>	75
5.1.1.2. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Achillea crithmifolia</i>	77
5.1.1.3. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Angelica panceicii</i>	79
5.1.1.4. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Angelica sylvestris</i>	81
5.1.1.5. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Artemisia absinthium</i>	83
5.1.1.6. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Hyssopus officinalis</i>	86
5.1.1.7. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Laserpitium latifolium</i>	89
5.1.1.8. Хемијски састав етарског уља врсте <i>Tanacetum parthenium</i>	90
5.1.2. Компаративна анализа антиоксидативне активности етарских уља одабраних биљних врста	94
5.1.3. Компаративна анализа антимикуробне активности етарских уља одабраних биљних врста	95
5.1.4. Синергистичко деловање етарског уља <i>A. sylvestris</i> и <i>A. panceicii</i> са антибиотиком еритромицином	118
5.2. <i>In vitro</i> контрола патогених бактерија пореклом из хуманог материјала деловањем метанолних екстраката	122
5.2.1. Компаративна анализа антиоксидативне активности метанолних екстраката одабраних биљних врста	122
5.2.2. Компаративна анализа антибактеријског деловања метанолних екстраката одабраних биљних врста	128
5.3. Биљне врсте потенцијални извор антимикуробних материја у решавању проблема резистенције	135
6. ЗАКЉУЧАК	140
7. ЛИТЕРАТУРА	144

8. ПРИЛОЗИ

162

- 8.1. Прилог I - Stanković, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatković, B., Matejić, J., Stankov-Jovanović, V., Kocić, B., Čomić, Lj. (2016). Comparative Study of Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Selected Aromatic Plants from Balkan Peninsula. *Planta Med.* DOI: 10.1055/s-0042-101942
- 8.2. Прилог II - Stanković, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatković, B., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V., Jović, J., Čomić, Lj., Kocić, B., Bernstein, N. (2016). Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula. *NJAS-WAGEN J LIFE SC.* DOI:10.1016/j.njas.2015.12.006
- 8.3. Прилог III - Stanković, N., Čomić, Lj., Kocić, B., Nikolić, D., Mihajilov-Krstev, T., Ilić, B., & Miladinović, D. (2011). Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije. *Hem. Ind.* 65 (5), 583–589
- 8.4. Прилог IV - Хроматограми са приказаним квалитативним и квантитативним хемијским саставом изолованих уља

9. БИОГРАФИЈА**10. БИБЛИОГРАФИЈА**

1. УВОД

Последњих деценија један од водећих проблема у медицини је стварање резистентности патогених микроорганизама на деловање антибиотика. Бактерије поседују веома добре механизме за генетичку размену што доприноси појави резистенције на антибиотике (Heritage и сар., 1999, Andersson, Hughes, 2010). Бактерије које показују значајну резистентност на постојеће антибиотике су: *Staphylococcus aureus* (метицилин резистентан - МРСА) (Biswajit и сар., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Lambert, 2002), *Acinetobacter* spp. (Maragakis, Perl, 2007), *Enterococcus* spp. (ванкомицин резистентан) (Siegel и сар., 2006), *Klebsiella pneumoniae* (карбапенемаза продукујуће бактерије) (Бубоња-Шоње, Абрам, 2014), итд. Антибиотици приликом деловања на патогене бактерије неселективно утичу и на непатогене бактерије, изазивајући при том непредвидљиве генетске промене (Martinez, Baquer, 2000). Поред корисних антимикуробних ефеката, расположиви антибиотици, такође, могу проузроковати и нежељене ефекте као што су хиперсензитивност и имуносупресија (Panigrahy и сар., 1979; Tsugata и сар., 2007). То су разлози због којих се трага за новим агенсима са антибиотским деловањем.

Један од природних извора антимикуробних активних супстанци су етарска уља и екстракти ароматичних биљака које се користе у традиционалној медицини за лечење многих болести, првенствено инфективних (Сарић, 1989, Sivastava и сар., 1996, Barton и сар., 1999). Употреба антимикуробних агенаса пореклом из биљака може утицати на смањивање прекомерног коришћења антибиотика, а самим тим и на смањивање могућности развоја бактеријске резистенције (Voon и сар., 2012). Поред употребе у медицинске сврхе, ароматичне биљке имају примену и у прехранбеној и у козметичкој индустрији, а у последње време налазе широку примену и у ароматерапији (Jančić и сар., 1995). Услед повећаних безбедносно-здравствених ризика који се јављају са све већом употребом синтетичких антиоксиданаса, од посебног је значаја и вредност ароматичних биљака као извора природних антиоксиданса који се могу користити у припреми дијететских суплемената или као природних конзерванса (Tiwari и сар., 2009).

Биљне врсте из фамилија Lamiaceae, Apiaceae и Asteraceae, које чине најзначајнији део флоре Балканског полуострва и Европе у погледу броја ароматичних врста које им припадају, имају важан медицински значај (Jančić и сар., 1995,

Стевановић, 1995). Многе врсте познате су и коришћене у традиционалној медицини, а њихова примена је потврђена и у научним истраживањима. На пример, надземни делови врсте *Hyssopus officinalis* се у народној медицини користе за лечење хроничног бронхитиса и астме или као антисептик, а научно су потврђени њени антимикробни, антивирусни, карминативни и благо спазмолитични ефекти (Туцаков, 1997, Тасић и сар., 2004). Биљне врсте *Angelica sylvestris* и *A. paniculata* се у народној медицини користе у исту сврху као и *A. archangelica* (Туцаков, 1997) тј. у третману бронхитиса, астме, грипа и других болести респираторног, васкуларног и дигестивног тракта (Asenov и сар., 1998, Тасић и сар., 2004). Корен биљне врсте *L. latifolium* се користи као диуретик и лаксатив, а плодови за регулисање апетита и као дигестив (Asenov, 1982). Врсте рода *Achillea* (*A. crithmifolia*, *A. millefolium*) су познате у лечењу различитих проблема гастроинтестиналног тракта, за побољшање апетита, за спољну употребу као антисептик, као и код разних упала. Надземни делови хајдучке траве (*Millefolii herba*), традиционално се користе у виду финог праха за брзо зацељивање рана (Туцаков, 1997), а у пресованом стању за лечење кожних чирева, отворених рана, екцема и отока (Asenov и сар., 1998). *Artemisia absinthium* се користи као средство за стимулисање апетита, као холагогик, холеретик, карминатив и стомахик (Тасић и сар., 2004). Такође, показује и антиинфламаторне и антихелминтичне ефекте и има употребу у лечењу рана и екцема (Asenov и сар., 1998). *Tanacetum parthenium* се првенствено користи у лечењу мигрене, затим вертига, артритиса, грознице, менструалних проблема, мучнине, зубобоље и уједа инсеката (Asenov и сар., 1998, Тасић и сар., 2004).

Инспирирани искуством из традиционалне медицине научници широм света испитују различите биолошке активности ароматичних биљака и трагају за чистим једињењима која су носиоци тих активности. У ранијим истраживањима је описан хемијски састав етарских уља биљних врста рода *Achillea*, *A. crithmifolia* (Палић и сар., 2003) и *A. grandifolia* (Suleimenov и сар., 2001, Радуловић и сар., 2010), затим *T. parthenium* (Rateb и сар., 2007, Izadi и сар., 2010, Polatoglu и сар., 2010, Mohsenzadeh и сар., 2011, Izadi и сар., 2010; 2013) и *H. officinalis* (Mazzanti и сар., 1998, Митић, Ђорђевић, 2000, Kizil и сар., 2010, Mahboubi и сар., 2011, Alizadeh и сар., 2011, Dehghanzadeh и сар., 2012), а највише хемијски састав уља *A. absinthium* (Chialva и сар., 1983, Juteau и сар., 2003, Orav и сар., 2006, Благојевић и сар., 2006, Rezaeinodehi, Khangholi, 2008, Baykan Erel и сар., 2012, Judzientiene и сар., 2012, Rajesh, 2013, Михајилов-Крстев и сар., 2014).

Антиоксидативна активност је одређивана за етарска уља врсте *A. grandifolia* (Павловић и сар., 2008), *H. officinalis* (Kizil и сар., 2010) и *A. absinthium* (Михајилов-Крстев и сар., 2014). У неким радовима су објављени подаци о антиоксидативној активности различитих екстраката, етанолног екстракта врсте *H. officinalis* (Alinezhad и сар., 2013), метанолног екстракта *T. parthenium* (Wu и сар., 2006) и различитих екстракта добијених из *A. absinthium* (Singh и сар., 2012) код којих је одређиван укупан садржај полифенола. Позната је и антирадикалска активност сесквитерпеноида ласерпитина и ацетилдезоксодехидроласерпитина, као и фенилпропаноида ласерина и латифолина који су изоловани из хлороформског екстракта биљне врсте *L. latifolium* (Поповић и сар., 2013). Антимикробна активност је испитивана за етарско уље врсте *A. grandifolia* (Радловић и сар., 2010), *A. crithmifolia*, (Палић и сар., 2003), *A. absinthium* (Juteau и сар., 2003, Благојевић и сар., 2006, Baykan Erel и сар., 2012, Михајилов-Крстев и сар., 2014), *T. parthenium* (Polatoglu и сар., 2010, Izadi и сар., 2010; 2013) и *H. officinalis* (Mazzanti и сар., 1998, Kizil и сар., 2010, Mahboubi и сар., 2011, Dehghanzadeh и сар., 2012), као и за метанолне екстракте биљних врста *A. absinthium* (Sengul и сар., 2011, Baykan Erel и сар., 2012), *H. officinalis* (Proestos и сар., 2005, Ozer и сар., 2006, Shinwari и сар., 2009), *A. crithmifolia* и екстракте семена биљне врсте *A. sylvestris* (Sarker и сар., 2003, Karaalp и сар., 2009). Описана је и антимикробна активност дихлорметана и метанолног екстракта плодова врсте *A. sylvestris* (Sarker и сар., 2003), активност умбелипренина (сесквитерпенског кумарина) изолованог из екстракта плодова неких врста овога рода (Sarker и сар., 2005), као и активност воденог, етанолног и етил-ацетатног екстракта надземних делова *A. sylvestris* (Брковић и сар., 2006). Међутим, у већини радова је коришћен само прелиминарни скрининг диск-дифузионом методом против релативно малог броја референтних микроорганизама, и само у једном случају против мултирезистентних бактерија изолованих из хуманог материјала тј. брисева рана.

Циљ овога рада је била компаративна анализа етарских уља и метанолних екстраката биљних врста *Hyssopus officinalis*, *Angelica sylvestris*, *Angelica panicii*, *Achillea crithmifolia*, *Achillea grandifolia*, *Artemisia absinthium*, *Tanacetum parthenium* и *Laserpitium latifolium* са локалитета на Југоисточном Балканском полуострву, тј. компарација њихових приноса, хемијског састава, антиоксидативне и антимикробне активности против мултирезистентних сојева патогених бактерија изолованих из хуманог материјала.

У овој дисертацији су презентовани нови подаци о антиоксидативној активности етарских уља биљних врста *A. sylvestris*, *A. pancicii*, *L. latifolium*, *A. crithmifolia* и *T. parthenium*, као и метанолних екстраката *A. pancicii*, *A. sylvestris*, *A. grandifolia*, *A. crithmifolia* и *H. officinalis*. Такође, нови су и подаци о антибактеријској активности етарских уља биљних врста *A. sylvestris*, *A. pancicii* и *A. grandifolia*, као и метанолних екстраката биљних врста *A. pancicii*, *A. grandifolia*, *L. latifolium* и *T. parthenium*. За све испитиване биљне врсте приказани су први резултати о њиховој антимикробној активности против мултирезистентних изолата из пацијената. У циљу превазилажења проблема мултирезистентности бактерија на деловање антибиотика, вршена су испитивања синергистичког деловања најактивнијих етарских уља и антибиотика.

2. ОПШТИ ДЕО И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Инфективне болести, патогеност и патогени микроорганизми

Под инфекцијом (назив потиче од латинске речи *infectio* - заражавање) се подразумева стање које је настало као резултат антагонистичког односа између макро- и микроорганизма у условима околне средине. Инфективни процес представља мултипликацију инфективног агенса у телу домаћина и обухвата непрекидно променљиве физиолошке и патолошке реакције чак и када нема видљивих симптома инфекције. Он укључује многобројне ензиме, токсине, структурне, биохемијске и имунолошке промене. Оштећења организма могу настати и деловањем токсина микроорганизма без њиховог директног присуства. Тада говоримо о интоксикацијама. (Каракашевић, 1987).

Патогеност и вируленција патогених микроорганизма су два уско повезана појма. Патогеност представља урођене, генетичке и морфо-физиолошке особине различитих таксона микроорганизма. Вируленција представља степен патогености (од латинске речи *virulentia* – отровност) и квантитативно изражава способност инфективног агенса да изазове обољење. Патогеност је стална и непроменљива особина извесних врста микроорганизма, док је вируленција променљива особина једног или више сојева исте врсте. Један сој неког патогеног микроорганизма може бити врло вирулентан (при чему ће у одговарајућем организму изазвати тешко обољење), слабо вирулентан или авирулентан (када неће изазвати никакво обољење). Сви механизми и фактори којима се људи и животиње бране од патогених микроорганизма називају се отпорност или резистенција домаћина према заразним болестима. Осетљивост домаћина према инфективним болестима може се дефинисати као непостојање отпорности. Зато се каже да су патогеност и вируленција микроорганизма и отпорност и осетљивост домаћина међусобно повезане и зависне реакције.

Патогени микроорганизми изазивају обољења код људи и животиња на различите начине у зависности од својих физиолошких особина. Да би неки патогени микроорганизам изазвао обољење он прво мора да доспе у потенцијалног домаћина.

Патогени микроорганизми могу у домаћина да уђу само на одређеним местима, а таква места називамо улазним местима заразе. Патогени микроорганизми могу до тих улазних места dospети само ако су преносиви, тако да је преносивост патогених микроорганизама од суштинске важности за изазивање инфекција.

2.2. Опис изабраних патогених микроорганизама

У патогене микроорганизме спадају бактерије, вируси, гљивице и паразити. Патогене бактерије су најзаступљенији патогени агенси одговорни за појаву великог броја болести. Бактерије су једноћелијски прокариотски микроорганизми који живе самостално или у разним групацијама или колонијама. На основу облика бактерије се деле на: а) округле (коке), које могу бити диплококе (две спојене ћелије, тетраде (групације од четири ћелија), сарцине (правилни коцкасти пакетићи ћелија), стрептококе (више ћелија у низу), стафилококе (неправилне скупине ћелија); б) штапићасте (бацили), са заобљеним или зашиљеним крајевима, појединачни или спојени по два или више у низу; ц) извијене (вибриони, спириле, спирохете и лептоспире) и д) кончасте. На основу захтева према кисеонику деле се на: аеробне (живе у условима са кисеоником), анаеробне (живе у условима без кисеоника) и факултативно анаеробне бактерије (живе у оба типа услова). Класификовање бактерија се врши и на: основу грађе ћелијског зида (Грам (+) и Грам (-) бактерије); величине (у μm); покретљивости (присуство или одсуство циљја и флагела); способности за стварање спора (спорулација); присуства или одсуства капсуле и начина размножавања (бинарна деоба, пупљење или фрагментација). Идентификација појединих родова и врста бактерија се врши уз помоћ њихових морфолошких (облик, величина и покретљивост ћелија и обојеност по Грам-у), културелних (карактеристике колонија и раста) и биохемијских особина (ферментација шећера, ИМВЦ – тест, способност нитрификације, амонификације, азотофиксације, итд.).

Неке врсте бактерија своје патогено дејство испољавају директним уништавањем ћелије свог домаћина, а друге (у које спада највећи број бактеријских врста) производе токсине који наносе штету метаболизму ћелија домаћина.

Бактерије могу изазвати локалне инфекције коже као што су нпр. стафилококне инфекције (фурункул, карбункул, импетиго, целулитис), а врло су честе и постоперативне инфекције хируршких рана и опекотина, као и инфекције дојки након

порођаја. Из сваког локалног жаришта инфекција се може ширити лимфом или крвљу по целом телу и изазвати сепсу и удаљену гнојну упалу било где у организму. При ширењу инфекције често настаје остеомијелитис других костију и ендокардитис. Неке бактерије могу изазвати и тешку упалу плућа код оперисаних болесника или компликацију вирусне респираторне инфекције, нарочито грипа и гнојног менингитиса. Инфекције горњих дисајних путева као што су прехлада, упала слузница носа (ринитис), упала грла (фарингитис), упала гласних жица (ларингитис) и упала крајника (тонзилитис) су врло честе инфекције и код деце и код одраслих. Узрочници ових обољења су најчешће вируси, али у око 15% случајева то су бактерије, укључујући и *Streptococcus pyogenes* (један од најчешћих узрочника стрептококне упале грла), као и *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae* и *Bordetella pertussis*. Код обољења доњих дисајних путева (нпр. бринхиектазија), у спутуму (испљувку) се најчешће изолује *Haemophilus influenzae*, а затим *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, итд.

У овом раду су испитиване следеће бактеријске врсте: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* sp. Бактерије су пореклом из брисева рана, брисева носа и грла, спутума и аспирата.

- *Staphylococcus aureus* -

Род *Staphylococcus* припада групи Грам (+) аеробних кока. Врсте овог рода могу бити патогене, условно патогене и непатогене. Најзначајнијеније бактерије овог рода су *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis* и *S. saprophiticus*. Код човека се најчешће налазе у назофаринксу и на кожи и присутне су око око 30% популације. Неке од наведених врста се налазе у гениталним органима жена. Такође се могу наћи у ваздуху слабопроветрених соба, у прабини, у млеку и другим животним намирницама.

Staphylococcus aureus је веома је распрострањен у људској популацији, медицински је значајан због своје патогености и резистенције према пеницилину и другим антибиотцима.

Морфологија: Стафилококе ове врсте су велике од 0,8 до 1,0 μm , расту појединачно, у паровима или у асиметрично збијене у веће или мање гроздове. Неки сојеви поседују капсулу, а неки слугави омотач. По Граму се боје позитивно, непокретне су и не стварају споре. Ћелијски зид се састоји из дебелог слоја муреина

који је повезан са тејхонском киселином и полисахаридима. *S. aureus* синтетише и продукује велики број различитих целуларних и екстрацелуларних супстанци којима изазива биолошке ефекте и код човека и код животиња. Целуларне супстанце су: пептидогликан ћелије, тејхојнаа киселина, капсуларна супстанца, фактор нагомилавања и протеин А. Екстрацелуларне су: α -хемолизин или α -токсин, β -хемолизин или β -токсин, γ -хемолизин или γ -токсин, δ -хемолизин или δ -токсин, леукоцидини, коагулаза, липазе, нуклеазе, протеазе, стафилокиназа, хијалуронидаза, ентеротоксини, епидермолитички токсини и пирогени токсини.

Културелне особине: *Staphylococcus aureus* најбоље расте у аеробним условима, мада може бити и факултативни анаероб. Оптимална температура за његов раст је од 35⁰С-37⁰С на рН 7,0-7,5. Колоније порасле на агару на дневном светлу на собној температури могу имати белу, зеленкастожуту или златножутубоју. У току раста на крвном агару код већине сојева се око колонија формира уска прозирна β -хемолитична зона из које је нестала боја хемоглобина. Колоније су глатке, конвексне и сјајне, а могу бити и патуљасте или храпаве. За разлику од других бактерија *S. aureus* није избирљив по питању подлога. У току 18-часовног раста једнолично замућује бујон, а у току продужене имкубације ствара на дну епрувете талог, док се на површини формира нежна кожа у облику прстена (Weisglass, 1989). Због своје изразите толеранције према NaCl, *S. aureus* добро успева у хранљивом бујону са 10% NaCl. О оваквом бујону инхибиран је раст већине Грам (-), али и многих Грам (+) бактерија. Зато се за изолацију стафилокока из разног материјала често користе подлоге са повишеном концентрацијом NaCl. Најчешћа селективна подлога за култивисање *S. aureus*-а је Baird-Parker-ова подлога. Она се састоји од хранљивог агара са додатком калијум телурита, глицина, пирувата и жуманцета јајета. На овој подлози *S. aureus* образује карактеристичне колоније са црним центром окруженим светлом зоном (халоом) која је понекад и мало мутна. Уколико се овој подлози дода полимиксин Б на њој се уопште не могу размножавати остале коагулаза негативне стафилококе.

Биохемијске особине: *Staphylococcus aureus* разграђује манитол уз продукцију киселине и гаса у аеробним и анаеробним условима. Сви сојеви *S. aureus* продукују врло активну и термостабилну дезоксирибонуклеазу, коагулазу и каталазу, а ни једна врста стафилокока не продукује индол. Каталаза је присутна и код осталих врста рода

Staphylococcus, док је коагулаза карактеристична само за коагулаза позитивне сојеве *S. aureus*.

Отпорност: *Staphylococcus aureus* као и остале стафилококе спада у врло отпорне бактерије. Већина угине на температури од 60⁰С тек после једног сата, а неки сојеви могу дуже живети и на температури од 80⁰С. Врло су отпорне и према сушењу, као и према садржају NaCl и шећера.

Антибиотска терапија: Сојеви стафилокока који не продукују пеницилиназу осетљиви су на бензил-пеницилин и друге пеницилине. Већина пеницилиназа позитивних стафилокока осетљива је на пеницилиназа-стабилне пеницилине. Међутим постоје и сојеви који су резистентни на метицилин (MRSA). Пеницилиназа позитивни сојеви стафилокока постају спорије или брже отпорни и на еритромицин, фусидинску киселину, канамицин и друге аминогликозиде и остале антибиотике. Међу сојевима *S. aureus* постоје мултирезистентни сојеви који су отпорни на више антибиотика, а обично се ради о болничким сојевима. Знатан проценат пеницилиназа позитивних сојева *S. aureus* је осетљив на цефокситин, цефалоспорине, клиндамицин и ванкомицин, међутим и према овим антибиотцима ови сојеви постају брзо резистентни. Антибиотска резистенција стафилокока је проузокована како пеницилиназом, тако и другим ензимима који разлажу разне антибиотике и хемиотерапеутике. Али постоје и други механизми код стафилокока који им обезбеђују отпорност према разним антибиотцима и хемиотерапеутицима. Ови механизми су углавном везани за плазмиде (Каракашевић, 1987).

- *Streptococcus pyogenes* -

Streptococcus pyogenes (β-хемолитички стрептокок серолошке групе А) припада групи Грам (+) аеробних кока.

Морфологија: Појединачне бактерије су округлог или овалног облика, међусобно повезане у ланце различите дужине. Пречник појединачних кока је од 0,8 до 1,0 μm. Стрептококе су непокретне, у свим младим културама окружене су видљивом капсулом, не стварају споре и поседују фимбрије (пили).

Културелне особине: *S. pyogenes* је факултативни анаероб. У бујону, бактерија добро расте и на собној температури, али је њен оптимум на 37⁰С. На температурама испод 10⁰С и преко 45⁰С, не расте. На крвном агару ствара различите колоније ширине око 1mm. Око колоније ствара зону β-хемолизе.

Биохемијске особине: *Streptococcus pyogenes* је каталаза негативан, разлаже глюкозу и трехалозу и врши редукцију метиленског плавог.

Отпорност: *Streptococcus pyogenes* је доста осетљив на спољашње утицаје. У бујону са 6,5%-тном концентрацијом NaCl, не расте. Пропада на температури од 60°C у року од пола сата. Осетљив је на дезинфицијенсе и сушење.

Токсичност: Група А стрептокока у току раста продукује око 20 различитих егзопродуката. Биолошке супстанце које продукује пиогени стрептокок су подељене на токсине и ензиме. Већина врши деполимеризацију супстрата и омогућава лакше ширење стрептокока у околна ткива. Токсини оштећују органе и ткива за које се вежу изазивајући директан токсички ефекат. Захваљујући бројним егзопродуктима пиогени стрептокок је типичан представник бактерија са токсичним и агресивним особинама. *S. pyogenes* изазива обољења која се могу поделити у три групе: инвазивна (запаљенско-гнојне природе); токсемична (локалне инфекције са знацима опште интоксикације) и постстрептококне секевеле (компликације предходне две инфекције). У зависности од ендогених и егзогених фактора секвеле се манифестују у два облика: реуматска грозница и гломерулонефритис (Бергер-Јекић, 1987).

Антибиотска терапија: Резистентан је на аминогликозиде, осим на гентамицин. Постоје сојеви резистентни на тетрациклине. Осетљив је на деловање пеницилина, еритромицина, доксициклина, цефалородина и бацитрацина (Weisglass, 1989).

- *Streptococcus pneumoniae* -

Streptococcus pneumoniae (пнеумокок) припада серолошкој групи Д стрептокока, мада не поседује групно специфичан антиген по Ланцефиелдовој.

Морфологија: *Streptococcus pneumoniae* је Грам (+) бактерија, узана, издужена диплокока са добро израженом капсулом. Понекад крајеви диплокока попримају изглед пламена свеће или ланцете. Диплококе су спојене својом базалном страном. Могу да расту у облику ланаца који су обавијени заједничком капсулом. У току учестале субкултивације капсула се постепено губи. Бактерија је непокретна и нема спора.

Културелне особине: Добро расте на хранљивим подлогама обогаћеним протеинима. Након 18 сати раста на температури од 37°C на крвном агару, уочљиве су колоније са добро израженом алфа хемолизом. Код анаеробне култивације може се јавити и бета хемолиза због деловања пнеумолизина О. Колоније су глатке, пљоснате и

прозирне. Након продужене инкубације могу постати непрозирне и храпаве. Пнеумокок у току раста дуфузно мути 10%-тни серумски бујон (Weisglass, 1989).

Биохемијске особине: *Streptococcus pneumoniae* хидролизује угљене хидрате без стварања гаса. Ферментација инулина је карактеристична за пнеумокок. Пнеумокок је каталаза негативан.

Отпорност: Летална температура је на 60⁰С након 30 минута. Осетљив је на деловање различитих дезинфицијенса, као и на деловање оптохина, кинина, жучи и жучних соли које доводе до лизе ћелија. У сасушеном спутуму и другим биолошким материјалима пнеумокок може дуго да преживи.

Антибиотска терапија: Осетљив је на деловање пеницилина, мада је још 70-их година прошлог века 1/5 укупно изолованих пнеумокока била резистентна на пеницилин. Све чешће се изолују сојеви пнеумокока који су мултирезистентни на антибиотике и сулфонамиде, као што су тетрациклини, еритромицин и линкомицин (Бергер-Јекић, 1987).

Патогеност за човека: Иако је *S. pneumoniae* део нормалне флоре респираторног тракта човека, он може изазвати обољења са различитом клиничком сликом. Пнеумокок код човека најчешће изазива лобарну (крипозну) пнеумонију и менингитис. Крипозна пнеумонија често рецидивира. Остали клинички облици пнеумококних инфекција људи су отитис медиа, синуситис, коњуктивитис, плеуритис, перикардитис, артритис, апсцеси, сепса и др. Пнеумокок у свом вирулентном облику изазива патолошке промене захваљујући својој способности размножавања у различитим ткивима. Иако не ствара токсине и факторе инвазивности који би утицали на његову вирулентност, пнеумокок захваљујући капсули је способан да изазове патолошко стање у човечијем организму.

- *Enterococcus faecalis* -

Морфологија: *Enterococcus faecalis* је Грам (+) бактерија, у облику диплокока или кратких ланаца, која је по ранијој класификацији припадала серолошкој групи Д стрептокока.

Културелне особине: Непокретан је, факултативни анаероб. Углавном је без хемолизе на крвном агару, код неких сојева са зоном α -хемолизе, а ретко са зоном β -хемолизе око колонија. Расте у распону од 10⁰С до 45⁰С.

Биохемијске особине: Ферментише глукозу без продукције гаса, каталаза негативан, хидролизује ескулин, расте у присуству жучи.

Отпорност: Врло је отпоран на алкалну средину (pH 9,6), као и на деловање жучних соли, детерџената, тешких метала, етанола и исушивање. Преживљава температуру од 60°C у трајању од 30 минута (Stuart и сар., 2006).

Антибиотска терапија: *Enterococcus faecalis* је отпоран на многе уобичајене антибиотике (аминогликозиде, цефалоспорине, клиндамицин, полусинтетички пеницилин нафцилин и оксацилин. Постаје чешће резистентан и на ванкомицин (Amyes, 2007; Courvalin, 2006).

Патогеност за људе: Настањује гастроинтестинални тракт људи и других сисара (Ryan и Ray, 2004). Попут других врста из рода *Enterococcus*, и *E. faecalis* може да изазове по здравље опасне инфекције код људи као што су: ендокардитис, бактеријемија, инфекције уринарног тракта и менингитис, посебно у болничким условима где је нарочито изражена антибиотска резистентност ове бактерије (Murray, 1990; Hidron и сар., 2008). У САД се *E. faecalis* повезује са болничким инфекцијама укључујући инфекције уринарног тракта, сепсу и инфекције оперативних рана. Постоји неколико фактора вируленције код *E. faecalis* који доприносе ширењу инфекције. Плазмид хемолизин, познат и као цитолизин, који је важан за патогенезу инфекција код животиња, у комбинацији са високом резистентношћу на гентамицин повезан је са петоструко већим ризиком од смрти код пацијената који имају бактеријемију (Ike и сар., 1984; Нууске и сар., 1991; Chow и сар., 1993).

- *Escherichia coli* -

Морфологија: *Escherichia coli* припада породици *Enterobacteriaceae*. То су Грам (-) аспорогени бацили чија је дужина од 1 до 3 μm , а дебљина 4 до 7. Покретни су, поседују бичеве, а велики проценат поседује и фимбрије (пили), а неки сојеви поседују и капсулу.

Културелне особине: *Escherichia coli* је аеробна и факултативно анаеробна бактерија. Расте добро на већини подлога. Култура *E. coli* је једнолично мутна у бујону, расте на обичним и селективним подлогама. Оптимална температура за њен развој је 37°C. Колоније су најчешће округле, глатке, сјајне, прозрачне и безбојне. На крвном агару многи сојеви стварају зону β -хемолизе око колонија, док на Ендо агару колоније добијају "метални сјај".

Биохемијске особине: Поседује способност ферментације разних шећера уз продукцију гаса и киселине. Уреу не хидролизује, не продукује H_2S и не отапа желатин. ИМВЦ- формула ове бактерија је ++ --.

Отпорност: На температури од $60^{\circ}C$ у трајању од 15 минута, не преживљава, а ниске температуре добро подноси. У контаминираним намирницама брзо се размножава. Осетљива је на хлор и хлорне препарате.

Антибиотска терапија: *Escherichia coli* је осетљива на деловање гентамицина, тетрациклина, полимиксина, хлорамфеникоал, колицина, ампицилина и цефалоспорина, а отпорна на бензил-пеницилин. Међутим, *E. coli* врло брзо стиче отпорност на антибиотике према којима је осетљива. У већини случајева отпорност је кодирана разним трансмисибилним плазмидима. Резистентност је понекад урођена, а често се заснива на деловању разних ензима које продукује *E. coli*. Чести су и мултирезистентни сојеви. Око 20% сојева *E. coli* из мокраће резистентно је на 5 до 6 антибиотика. Овакви сојеви располажу преносном антибиотском резистенцијом (Каракашевић, 1987).

Антигенски састав: *E. coli* има сложен антигенски састав. Скоро сваки сој садржи соматски "О" антиген, флагеларни "Х" и капсуларни "К" антиген. Доказано је да су уз одређени антигени састав везана и нека патогена својства *E. coli*, као на пример код ентерохеморагичног соја O157: H7.

Токсичност: Токсичност сојева *E. coli* се базира на њеном лучењу разних ентеротоксина, адхезина или фактора колонизације, хемолизина и ендотоксина.

Патогеност за људе: Патогеност за човека се испољава у способности ових бактерија да изазову две групе обољења (Бергер-Јекић, 1997):

- у прву групу спадају *E. coli* изазивачи пиогених инфекција (циститис, пијелитис, пијелонефритис, инфекције жучне кесе, менингитис, сепса)
- у другу групу спадају *E. coli* изазивачи дијарејних обољења. На основу патогености и фактора вируленције, ове ентеровирулентне *E. coli* се деле на:

1. Ентеротоксигене *E. coli* (ЕТЕС)

Ова група *E. coli* узрокује дијареју код мале деце и одојчади у земљама у развоју, чести су узрочници дијареје путника и изазивају колери слично обољење, у земљама у којима је колера ендемична. Механизам патогености се заснива на способности ових бактерија да колонизују цревну слузницу и да она продукују биолошки активне егзотоксине (ентеротоксине). Бактерије продукују две врсте

токсина: термолабилни (ЛТ) и/или термостабилни (СТ) токсин. Термолабилни ентеротоксин (ЛТ) се састоји од 2 субјединице, једна јединица му омогућава везивање и продор у епителне ћелије црева, а друга субјединица има токсично дејство. Друга субјединица затим унутар ћелије стимулише активност ензима, који доводе до нагомилавања цикличног аденозин монофосфата (ЦАМФ), а као последица свега тога, долази до излучивања воде и електролита у лумен црева, дијареје и дехидратације. Термостабилни ентеротоксин (СТ) остаје стабилан и биолошки активан и након деловања повишене температуре, ефекат му се испољава повећаном активношћу ензима гванилат циклазе и повећаном концентрацијом ЦГМФ.

2. Ентеропатогене *E. coli* (ЕПЕС)

Ова група изазива дијареју код мале деце и беба у земљама које су у развоју. Раније је узроковала интрехоспиталне епидемије у породилиштима и дечијим одељењима и у развијеним земљама. Дијареја је удружена са повишеном телесном температуром. У столици се налазе слуз и леукоцити као знак реактивног запаљења. Механизам патогености ове групе *E. coli* није још потпуно расветљен.

3. Ентероинвазивне *E. coli* (ЕИЕС)

E. coli које припадају овој групи бактерија изазивају обољење слично дизентерији те се зато назвају "дизентерични сојеви" *E. coli*. Механизам патогености је заснован на инвазивним особинама ових сојева – продирању у епителне ћелије дебелог црева. Бактерије унутар ћелија дебелог црева се брзо размножавају. Такође, продиру у околне ћелије изазивајући интрацелуларно ширење, некрозу и смрт ћелије домаћина, улцерацију и реактивно запаљење. Столица врло брзо постаје оскудна, са обавезним присуством крви у столици, гноја и обилне слузи (тј. "дизентерични испљувак"). Ова група испољава неке особине сличне шигелама. Доказивање инвазивности се врши *in vivo* уз помоћ Серени (Sereny) теста и *in vivo* на Нер-2 култури ћелија.

4. Ентерохеморагичне *E. coli* (ЕХЕС)

Ово је група *E. coli* која узрокују спорадичне и епидемијске случајеве хеморагичног колитиса, код којих се у око 10% јавља компликација – хемолитични уремични синдром (ХУС). Механизам патогености се заснива на везивању бактерија за зид дебелог црева и за зид терминалног дела танког црева, након тога бактерије луче токсине са цитотоксичним ефектом.

5. Ентероагрегативне *E. coli* (ЕАГТЕС)

Бактерије које припадају овој групи *E. coli* узрокују перзистентне дијареје у новорођене деце у земљама у развоју, са повраћањем и профузним, течним столицама. Механизам патогености ових бактерија се заснива на способности агрегативне адхеренције (АА) за епителне ћелије домаћина. Ове *E. coli* подстичу и повећано лучење слузи, а бактерије се налазе и међусобно слеplјене у овом биофилму – аутоагломерација. Како је услед агрегативне адхеренције за цревни епител спречена апсорпција течности, настају профузне, перзистентне дијареје. Доказана је и продукција термостабилног ентеротоксина (ЕАСТ), али му је улога још нејасна. Плазмид величине 60 мегадалтона кодира и агрегативну адхеренцију и продукцију токсина.

- *Klebsiella* sp. -

Роду *Klebsiella* припадају следеће 4 врсте бактерија: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena* и *K. planticola*. То су Грам (-), капсулиране бактерије које се карактеришу слузавим растом. По здравље човека најопаснија је *K. pneumoniae* која поседује следеће подврсте: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* и *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Остале врсте ретко угрожавају здравље човека.

Морфологија: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* је Грам (-) заобљени кокобацил, у просеку дуг 1 μm , а широк од 0,5 до 0,8 μm . Јавља се појединачно и у паровима, непокретан је и не ствара споре.

Културелне особине: Факултативни је анаероб. Добро расте на свим основним подлогама при температури од 37⁰С. На подлогама где су додати угљени хидрати и крв, колоније су широке, конвексне, сјајне и слузаве. Код продужене инкубације колоније се спајају.

Биохемијске особине: Ферментише лактозу, глукозу, сахарозу и неке друге угљене хидрате уз продукцију киселина и обично гаса, а "метилред" реакција је негативна.

Отпорност: Пропада на температури од 55⁰С за пола сата, али је прилично отпорна на стандардне дезинфицијенсе (Weisglass, 1989).

Антибиотска терапија: Осетљива је на нитрофурантоин и налидиксинску киселину, гентамицин, полимиксин, тетрациклин, хлорамфеникол, стрептомицин, цефалоспорине, мада осетљивост варира од соја до соја. Врло брзо постају отпорни на антибиотике на које су били осетљиви. Отпорна је на ампицилин и карбенцилин.

Антигенска структура: садржи соматски О- и Р-антиген и капсуларни К-антиген.

Патогеност за људе: Ова бактерија може својим ендотоксином и некротичном супстанцом да изазове тешка оштећења скоро свих делова човечијег организма. Та обољења настају нарочито кад ослаби отпорност организма, нарочито код хроничних болести. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* најчешће изазива обољења респираторних путева као што су фарингитиси, назофарингитиси, ринитиси, лобарна пнеумонија и бронхопнеумонија. Често изазива ентеритисе и ентероколитисе код деце, врло су честе инфекције мокраћних путева, а понекад се јављају менингитиси и септикемије изазване овом бактеријом. *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* је узрочник риносклерома, хроничног обољења слузнице и коже, нарочито носа, при чему настају туморозне масе. *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* је карактеристична по изазивању хроничног, атрофичног обољења озаена или *Rhinitis trophicans*.

- *Proteus mirabilis* -

Морфологија: *Proteus mirabilis* припада роду *Proteus* у који су поред њега сврстани још *P. vulgaris* и *P. mxyofaciens*. Ово су Грам (-) кокобацили, а понекад попримају нитасте облике. Дужина им варира од 1 до 3 μm , а ширина од 0,4 до 0,6 μm . Јављају се појединачно, у паровима и у кратким ланцима. Брзо се крећу помоћу перитрихијално распоређених бичева. Немају капсуле, ни споре. Понекад поседују фимбрије.

Културелне особине: Све врсте рода *Proteus* се брзо размножавају у течним и чврстим подлогама. Колоније су развучене и слабо омеђене. Често расту у облику концентричних кругова око средишта колоније и тако могу прекрити целу површину подлоге ("ројење"). Све врсте рода *Proteus* најбољи раст постижу на температури од 30 до 37°C, али могу да расту и на температурама у распону од 10 до 43°C. На крвном агару најчешће стварају хемолизу. Културе имају карактеристичан мирис на трулеж.

Биохемијске особине: Ни једна врста рода *Proteus* не ферментује лактозу. Све врсте брзо хидролизују уреу и врше деаминацију фенилаланина у фенилпирувичну киселину (Weisglass, 1989).

Отпорност: Врсте овог рода су релативно отпорне према утицајима спољашње средине. Летална температура је 55°C у року од 1 часа. Осетљиве су на уобичајене

дезинфицијенсе. Међутим, сојеви који се налазе у болничким установама отпорни су на знатне количине дезинфицијенса, нарочито сојеви *P. mirabilis*.

Антибиотска терапија: *Proteus mirabilis* који се најчешће изолује из мокраће, осетљив је на пеницилин Г и ампицилин, док је *P. vulgaris* неосетљив на пеницилин. Обе врсте су осетљиве на налидиксинску киселину и резистентне на бацитрацин, полимиксин и колистин. Резистенција врста *Proteus* на антибиотике је једним делом урођена, а другим делом стечена преко Р-плазмида (Каракашевић, 1987).

Патогеност за људе: *Proteus mirabilis* и *P. vulgaris* изазивају разне септичке инфекције, често удружене са другим бактеријама. Често изазивају инфекције рана, нарочито опекотина. Могу изазвати сепсу и менингитис. Чести су узрочници алиментарних токсинфекција, као и инфекција урогениталног тракта које најчешће настају после катетеризације, цистоскопије и других интервенција на урогениталном тракту (у болничким условима).

- *Pseudomonas aeruginosa* -

Pseudomonas aeruginosa заједно са *P. putida* и *P. fluorescens* припада ткзв. "флуоресцентној групи" бактерија зато што све ове бактерије продукују флуоресцентни пигмент.

Морфологија: *Pseudomonas aeruginosa* је мали, обично прав, ређе нешто савијен Грам (-) штапић, дужине од 1,5 до 3 μm и ширине од 0,5 до 0,8 μm . Има једну флагелу (понекад и 3) на једном од полова и помоћу ње се брзо креће. Такође поседује и фимбрије. Не продукује спору и немају капсулу.

Културелне особине: *Pseudomonas aeruginosa* је аеробна и условно анаеробна бактерија. Добро успева на већини хранљивих подлога, оптимална температура за раст је од 30⁰С до 37⁰С, а преживљава и на 42⁰С. На површини подлога се формирају неправилно округласте, разливане колоније сивкасте боје. Колоније су пречника од 2 до 3 mm. Често се сливају, а могу и да роје. Колоније нису пигментисане, али продукују два пигмента: један је плавкасто зелени феназински пигмент, пиоцијанин, а други је зелено жути, флуоресцин. Оба пигмента дифундују у подлогу и окружују колоније.

Биохемијске особине: Биохемијски је врло неактивна бактерија која од угљених хидрата разграђује само гликозу уз продукцију мале количине киселине. Не ствара индол. Желатин ликвефакује.

Отпорност: Температура од 60⁰С је убија у року од пола сата. Према дезинфицијенсима је отпорнија од већине бактерија.

Токсичност: Продукују ендо и егзотоксин, као и већи број ензима (протеазе, колагеназе, липазе и еластазе), хемолизин и леукоцидин. Ове супстанце доприносе њеној токсичности (Weisglass, 1989).

Антибиотска терапија: *Pseudomonas aeruginosa* је отпоран на већину антибиотика. Претпоставља се да тој отпорности доприноси слузава превлака и липополисахаридна компонента бактерија. Такође продукују и до 8 различитих бета-лактамаза и 5-6 аминогликозидаза. Осетљива је на аминогликозиде, амикацин, гентамицин и сулфамилон. Поседује природну отпорност према пеницилину и β-лактамским антибиотцима. Ова отпорност се објашњава постојањем специфичног ћелијског зида, као и могућношћу да избаце антибиотик из ћелије пре него што он почне да делује (тзв. АБЦ транспортери).

Патогеност за људе: *Pseudomonas aeruginosa* изазива читав низ разних инфективних обољења код људи. Сва та обољења се називају "пseudомонијазе". Честе су инфекције код новорођенчади у комбинацији са другим Грам (-) аспорогеним анаеробним бактеријама. Честе су инфекције овом бактеријом код имунодефицијентних особа. Пseudомонијазе су све чешће услед повећане резистентности на постојеће антибиотике. Чести су мултирезистентни сојеви који су отпорни и на 5 до 6 антибиотика. У порасту су интрахоспиталне инфекције, па чак и епидемије изазване овом бактеријом. *Pseudomonas aeruginosa* је изазивач тешких инфекција опекотина, ентеритиса, минигитиса, ендокардитиса, као и инфекција респираторног и урогениталног тракта, које настају и у садејству са другим пиогеним бактеријама. Из свих тих жаришта *P. aeruginosa* може продрети у крв и проузоквати тешку септикемију (Каракашевић, 1987).

- *Acinetobacter* sp. -

Већина аутора је раније сматрала да род *Acinetobacter* има само једну врсту – *A. calcoaceticus*. Данас у овај род сврставамо тзв. АЦБ комплекс (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus* и *Acinetobacter* геномску врсту 13ТУ) (O'Shea, 2012; Gerner-Smidt, 1992).

Морфологија: Морфолошки су то Грам (-) штапићи дужине 1,5 до 2,5 μm и ширине од 0,9 до 1,6 μm, који у статичној фази добијају сферични облик. Не стварају

споре. Јављају се појединачно и у паровима. Неки сојеви поседују капсулу која ствара мукоидну превлаку.

Културелне особине: Стриктни су аероби. Добро расту на свим хранљивим подлогама. Расту на температурама од 20 до 30°C, а оптимална температура је у распону од 33 до 37°C. На крвном агару, формирају сивкасто-беле колоније, средње величине, након инкубације у трајању од 24 часа на 37°C.

Биохемијске особине: *Acinetobacter* се сматра неферментативним организмом, али неки изолати производе киселину када расту на 10% глукозном агару. Оксидаза је негативан.

Отпорност: Отпорне су на спољашње утицаје, као и на већину стандардних дезинфицијенса.

Антибиотска терапија: Сојеви су отпорни на већину антибиотика, али су осетљиви на канамицин и карбенцилин (Weisglass, 1989), као и на одређене цефалоспорине. Ова отпорност је једним делом унутрашња, генетска, а другим делом је ензимске природе. Многи сојеви поред β -лактамаза, продукују и аминогликозидазе (Каракашевић, 1987).

Патогеност за људе: Бактерије овог рода су убиквитарне. Релативно често се налазе на кожи особља у болницама. Најчешће нападају хоспитализоване болеснике, болеснике у интензивној нези, као и све имунокомпримоване особе. Често напада и болеснике који се лече антибиотцима. Учестали су случајеви пнеумоније, менингитиса, септикемија, инфекција рана и урогениталног тракта које су изазване овом бактеријом.

2.3. Механизми деловања антибиотика на патогене микроорганизме

Супстанце које убијају микроорганизме или спречавају њихово размножавање у живом организму и које се могу користити за лечење и спречавање заразних болести називају се једним именом хемиотерапијска средства (Каракашевић, 1987). Хемиотерапијска средства се деле на хемиотерапеутике и антибиотике. Хемиотерапеутици су антимикробна једињења за лечење и спречавање заразних обољења која се добијају синтетским путем, из разних материја, док су антибиотици антимикробна једињења која су метаболички продукти, најчешће бактерија и гљива.

Међутим, данас се неки антибиотици синтетишу од хемијских сировина, а основна антибиотска једињења која се добијају из живих бића се хемијски модификују.

Хемиотерапеутици и антибиотици делују микробиостатички и микробиоцидно. Ове ефекте они могу изазвати на разне начине. За већину ових једињења је познат начин деловања, али постоје и она чији механизам деловања још увек није познат. За сад су познати следећи механизми деловања хемиотерапијских средстава: 1) метаболички антагонизам, 2) инхибиција синтезе ћелијског зида, 3) промена пермеабилности цитоплазматичне мембране, 4) инхибиција синтезе протеина, 5) инхибиција функције и синтезе нуклеинских киселина и 6) непознато деловање.

1) Метаболички антагонизам настаје када хемиотерапијско средство (антибиотик), због своје хемијске сличности са неким од есенцијаних метаболита микроорганизама и већег афинитета према ензиму, ступа у реакцију са ензимом при чему настаје нефункционално једињење које онемогућава бактеријској ћелији синтезу одређених битних једињења и стога ћелија престаје да расте или умире. Постоји више начина како антимикробни агенс (антибиотик) може утицати на инактивацију ензима. То су: а) директно везивање агенса за активно место ензима за које се веже супстрат, затим б) директно везивање за место везивања кофактора, ц) модификација везивања супстрата или кофактора и д) дезорганизација активног места ензима неспецифичним везивањем за друго место ензима ван активног места (алостеричка модификација).

а) Пример за први начин деловања представља сулфонамид, који је аналог пара-аминобензоинској киселини. Парааминобензоинска киселина је претеча фолне киселине која је есенцијани метаболит, а сулфонамиди се вежу за ензиме где би се иначе требала везати ПАБА. Сви сулфонамиди су компетитивни инхибитори ПАБА за ензим дихидроптероат синтазу у биосинтетском путу тетрахидрофолне киселине (Тописировић и Јовчић, 2013). Триметоприм је компетитивни инхибитор синтезе тетрахидрофолне киселине, али он инхибира активност ензима дихидрофолат редуктазе.

б) Други начин деловања је карактеристичан за флуороникотинску киселину и изонијазид, који се инкорпорирају у аналоге никотин амид динуклеотида уместо никотинамидског дела молекула, односно инхибирају раст бактерија делујући на нивоу синтезе коензима, што је много чешће него преко конкуренције са коензимом за активно место.

ц) Антибиотици псикофуранин и декоинин делују по принципу алостеричких инхибитора на биосинтезу пурина, пошто су оба ова молекула структурни аналози аденозина који регулише активност ензима ксантин-5'-фосфат аминазе. Везивање ових молекула за алостеричко место на езиму доводи до промене нативне конформације ензима, што има за последицу промену структуре и организације активног места, а самим тим и смањеног афинитета ентима према супстрату (Тописировић и Јовчић, 2013).

2) Бактеријска ћелија која не може да синтетише ћелијски зид остаје без могућности да регулише осмотске процесе, али и без врло важних једињења која се налазе у ћелијском зиду. То су мураминска, диаминопимелинска, тејхојна и д-глутаминска киселина, као и д-аланин. Хемиотерапијска средства (антибиотици) могу да инхибирају инкорпорисање појединих од наведених једињења у ћелијски зид, а тиме и синтезу ћелијског зида. Инхибиција синтезе пептидогликана (макромолекул који има централну улогу у одржавању интегритета ћелијског зида) је један од начина деловања антибиотика. Она се може поделити на: а) антибиотике који су инхибитори биосинтетских ензима, б) антибиотике који су инхибитори функције C_{55} -липидног носача, ц) антибиотике који се везују за интермедијере у процесу биосинтезе пептидогликана и д) антибиотике инхибиторе умрежавања пептидогликана у зиду.

а) Фосфомицин је један од антибиотика који делује као инхибитор биосинтетских ензима, конкретно UDP-N-ацетилглукозамин-3-енолпирувилетер синтазе, пошто се он јавља као аналог фосфоенолпирувата и ковалентно се везује за овај ензим. Д-циклосерин (оксамицин) је још један из групе антибиотика који делују на сличан начин при чему он може деловати на три ензима који учествују у уградњи дипептида аланина у муропептид.

б) Бацитрацин је антибиотик из групе инхибитора функције C_{55} -липидног носача. Имидазолни прстен хистидина у бацитрацину је од кључног значаја за везивање јона метала и дифосфатног дела C_{55} -липида. Услед формирања овог комплекса долази до онемогућавања деловања ензима фосфатазе.

ц) Ванкомицин припада групи антибиотика који се везују за интермедијере у синтези пептидогликана и он доводи до инхибиције синтезе пептидогликана стварањем комплекса са уридин дифосфат - N-ацетилмураминска киселина -пентапептидом (UDP-NAM-пентапептидом) који поседује два терминална Д-аланина. Није у потпуности јасно како стварање овог комплекса доводи до инхибиције активности појединих

ензима који катализују синтезу пептидогликана, али је утврђено да ванкомицин инхибира ензиме лизозим, мурамидазу и трансглицозидазу. Антибиотик ристоцетин делује на сличан начин као и ванкомицин.

д) У групу антибиотика који инхибирају полимеризацију пептидогликана спадају β -лактамски антибиотици (пеницилини, цефалоспорини, цефамицини, клавулинска киселина, оливанска киселина, тиенамицин, никардицин и монобактами. Доказано је да бактерије у присуству пеницилина имају више слободног Д-аланина и већу пропорцију слободних NH_2 -група глицина, што указује да пеницилин инхибира умрежавање пептидогликана, односно да у његовом присуству не долази до синтезе пептидогликана, већ до стварања фрагмената и акумулације муропептида и последично до могуће лизе бактерија (Тописировић и Јовчић, 2013).

3) Поједина хемиотерапијска средства (антибиотици) могу да измене цитоплазматичну мембрану, и да на тај начин наруше одвијање најважнијих функција у ћелији. На пример, могу да онемогуће дифузију између цитоплазме и спољашње средине, односно да доведу до немогућности исхране ћелије. Такође, долази до поремећаја регулације респираторних ензима (аденозин трифосфат синтаза) и биосинтезе на или у цитоплазматичној мембрани. Изостанак било које од наведених функција доводи до смрти бактерије. Антибиотике који утичу на структуру и функцију цитоплазматичне мемbrane делимо на оне који: а) доводе до дезорганизације мемbrane, б) формирају водене поре у мембрани, ц) изазивају специфичне промене у пермеабилности катјона (јонофоре), д) инхибирају ензиме у мембрани.

а) Групи антибиотика који изазивају дезорганизацију мемbrane припадају полимиксини и октапептини, који представљају једињења са амфифиличним молекулима који поседују дефинисане, али раздвојене хидрофилне и хидрофобне регионе, па зато могу интераговати са фосфолипидима или протеин-липид комплексима у цитоплазматичној мембрани, изазивајући а тај начин њену дезорганизацију.

б) Постоји неколико група антибиотика који формирају водене поре у мембрани на неколико начина: грамицидини (изузев грамицидина С) стварају поре у цитоплазматичној мембрани захваљујући њиховој хеликоидној структури; деловање полиена (нистатин, амфотерицин Б, итд) на ћелијске мемbrane је условљено присуством стерола у мембрани, док молекули аламетицина и сузакацилина формирају

дугачке олигомере чијим спајањем настаје пора у мембрани кроз коју је могућ транспорт јона.

ц) Јонофоре, група антибиотика растворљивих у води, имају особину да омогућавају пролазак неорганских катјона кроз цитоплазматичну мембрану стварајући при том хидрофобни комплекс јонофора-катјон. Овој групи антибиотика припадају валиномицин, ениатини и макротетралиди (нонактин, монактин, диактин и др.).

д) Када говоримо о групи антибиотика који су инхибитори ензима у мембрани, онда превасходно говоримо о агенсима који директно или индиректно утичу на ензим аденозинтрифосфат-синтазу, најважнији ензимски систем у биолошким мембранама који је укључен у биосинтезу аденозинтрифосфата, најбитнијег енергетског молекула у живим системима. Аденозинтрифосфат-синтаза се састоји од $\Phi 1$ и $\Phi 0$ компоненте које су међусобно повезане $\Phi 1$ -инхибитором. Инхибитори изазивају инактивацију ензима тако што се директно везују за компоненту аденозинтрифосфат синтазе која учествује у процесу катализе биосинтезе аденозинтрифосфата или за неку другу компоненту самог ензима или за компоненту мембране која се налази у непосредном контакту са аденозинтрифосфат синтазом. У ову групу антибиотика спадају ауровертини, цитреовиридини и кверцетин (директни инхибитори) и олигомицини, рутамицин, осамицин и др. (индиректни инхибитори АТФ синтазе) (Тописировић и Јовчић, 2013).

4) Многа хемиотерапијска средства (антибиотици) могу да делују инхибиторно на синтезу протеина на различитим нивоима. Најчешће ометају преношење аминокиселина, инхибирају функцију 30S или 50S подјединица рибозома и формирање полирибозома (Schluenzen и сар., 2000). Инхибитори 30S подјединица су аминогликозиди (стрептомицин, неомицин, канамицин, гентамицин, итд), тетрациклини, док су инхибитори 50S подјединица хлорамфеникол, линкозамини, макролиди (еритромицин, азитромицин и други). Делимо их у више група и то: а) инхибиторе формирања аминоацил-тРНК, б) инхибиторе иницијације синтезе протеина, ц) инхибиторе елонгације полипептидног ланца и д) инхибиторе терминације синтезе протеина.

а) Инхибитори формирања аминоацил-тРНК (шаржирање тРНК аминокиселином) се могу поделити на инхибиторе синтезе формилметионин-тРНК и инхибиторе синтезе осталих аминоацил-тРНК. Своје инхибиторно деловање испољавају тако што се специфично везују за одређени ензим. На пример, антибиотик

борелидин се везује само за ензим треонин-тРНК синтетазу у бактерији *E. coli* или антибиотик фураномицин који специфично инхибира изолеуцил-тРНК синтетазу.

б) Инхибитори иницијације синтезе протеина своју активност остварују на тај начин што спречавају или а) везивање иРНК за 30S субјединицу; или б) везивање ф-мет-тРНК за 30S субјединицу; или ц) везивање 50S субјединице за 30S комплекс иницијације. Овој групи припадају едеини, касугамицин, пактамицин и оксазолидинони.

ц) Инхибитори елонгације полипептидног ланца могу се поделити на: а) инхибиторе везивања аминоксил-тРНК за А место рибозома, катализовано од стране елонгационог фактора ЕФ-Ту, б) инхибиторе транспептидације, ц) инхибиторе транслокације и д) инхибиторе функционисања елонгационих фактора ЕФ-Ту и ЕФ-Г. У ову групу инхибитора спадају антибиотици тетрациклини чије се инхибиторно деловање остварује спречавањем правилног препознавања кодона на иРНК и антикодона на тРНК на 30S субјединици рибозома (Тописировић и Јовчић, 2013). Такође овде припадају и тиостептони, као и аминокликозиди, међу којима и стрептомицин који изазива дисторзију 30S субјединице рибозома и утиче на погрешно читање кодона на иРНК и као и на процес иницијације у синтези протеина (Тописировић и Јовчић, 2013). У групу аминокликозида спадају још и канамицини, неомицини, гентамицини, хлорамфеникол и др.

д) У инхибиторе терминације синтезе протеина спада антибиотик негамицин за кога се сматра да, осим што делује на процес иницијације синтезе протеина, примарно делује на процес терминације и то на процес ослобађања насцентног полипептида са рибозома.

5) Поједина хемиотерапијска средства (антибиотици) инхибирају синтезу нуклеинских киселина тако што се везују за ДНК и на тај начин спречавају формирање РНК. Друга врше деполимеризацију ДНК или блокирају њену синтезу, а трећа се инкорпорирају у ДНК уместо пуринских и пиримидинских база. На основу нових сазнања, инхибиторе синтезе нуклеинских киселина можемо поделити у две групе: а) агенсе који интерферирају са метаболизмом нуклеотида и б) агенсе који инхибирају репликацију и транскрипцију.

а) Групу агенаса који интерферирају са метаболизмом нуклеотида делимо на:

- инхибиторе *de novo* синтезе и интерконверзије нуклеотида, где спадају антибиотици азасерин и 6-диазо-5-оксо-Л-норлеуцин, који инхибирају синтезу пурина

као аналози Л-глутамина, односно инхибирају активност ензима формилглицинамидинриботид синтетазе. Затим, метотрексат, триметоприм, пириметамин који су реверзибилни инхибитори ензима дихидрофолат редуктазе који учествује у биосинтези тетраhydroфолне киселине која утиче на процес биосинтезе пурина и пиримидина. У ову групу агенаса спадају још и ксилозиладенин, псикофуранин, декоинин и др;

- инхибиторе коришћења нуклеотида, као што су арабинозилцитозин и арабинозиладенин који инхибирају синтезу ДНК, тако што инхибирају ензим ДНК полимеразу;

- инхибиторе који се уграђују у полинуклеотиде, при чему се једни директно инкорпорирају у молекул ДНК уместо природних нуклеотида (5-бромодеооксиуридин и 5-јододеооксиуридин који замењују тимин у молекулу ДНК), други врше супституцију нуклеозида (антибиотици туберицидин, формицин и 8-азагуанин који се могу превести у нуклеотиде и инкорпорирати у РНК на месту нормалних нуклеотида, док се трећи инкорпорирају у полинуклеотиде (антибиотик кордицепином који се уграђује у растући 3'- крај РНК у процесу транскрипције и с обзиром да не поседује ОН-групу на С₃-атому рибозе, даља полимеризација ланца, односно синтеза РНК се прекида) (Тописировић и Јовчић, 2013).

б) Групу агенаса који инхибирају репликацију и транскрипцију можемо поделити на:

- класичне интеркалирајуће агенсе (агенси акридини и етидијуми који инхибирају синтезу ДНК на тај начин што инхибирају активност ензима ДНК полимеразе, а синтезу РНК инхибирањем ензима ДНК зависне РНК полимеразе, док се антибиотик актиномицин Д који се везује за молекул ДНК јавља као специфичан инхибитор ензима ДНК зависне РНК синтезе)

- остале интеркалирајући агенси, који остварују свој ефекат путем интеркалације у молекул ДНК (дауномицин, адриамицин, ногалимицин, елиптицин, кинин хлорокинин и тилорон)

- агенсе који праве мостове или прекиде у молекулу ДНК (антибиотик митомицин Ц који успоставља ковалентну везу међу комплементарним ланцима ДНК стварајући при томе интерланчани мост који онемогућава синтезу нових молекула ДНК пошто онемогућава одвајање ланца што је предуслов за репликацију ДНК, док

антибиотик блеомицин утиче на стварање једноланчаних и дволанчаних прекида у третираној ДНК)

- инхибиторе РНК полимеразе (антибиотик рифампицин који специфично инхибира синтезу РНК делујући на ензим РНК полимеразу, као и антибиотици стрептоварицин и стрептолидигин)

- инхибиторе репликације ДНК (хинолонски антибиотици - налидиксинска киселина и оксолинска киселина који доводе до инхибиције репликације ДНК утичићи инхибиторно на ензим ДНК гиразу која има улогу у одвијању хеликса ДНК, што је неопходан услов за репликацију ДНК, док антибиотици новобиоцин и коумермицин своје инхибиторна деловање у синтези ДНК остварују делујући на субјединицу Б ензима ДНК гиразе) (Тописировић и Јовчић, 2013).

У овом истраживању као референтни антибиотици су коришћени доксициклин, ципрофлоксацин, гентамицин и еритромицин. Доксициклин (Вибрамицин) је антибиотик широког спектра деловања из групе тетрациклина, са бактериостатским дејством на велики број микроорганизама (Грам (+) и Грам (-) бактерије, рикеције, хламидије, микоплазме, борелије, лептоспире и др.). У бактеријској ћелији доксициклин се везује за 30S субјединицу рибозома и на тај начин се сврстава у групу антибиотика који инхибирају синтезу протеина. Ципрофлоксацин је системски флуорохинолонски антибиотик са широким спектром антимикробног деловања. Механизам деловања је блокада ензима ДНК-гиразе бактерије и поремећај у синтези ДНК, што доводи до фрагментирања и смрти бактеријске ћелије. Антибактеријски спектар ципрофлоксацина обухвата велики број микроорганизама, укључујући и сојеве резистентне на друге антибиотике. Бактерицидно делује на већину Грам (-) и на неке Грам (+) микроорганизме. Гентамицин је антибиотик из групе аминогликозида. Гентамицин делује на велики број патогених бактерија. У комбинацији са пеницилином делује и на *E. faecalis*. Не делује на *S. pneumoniae*, нити на већину других стрептокока и анаероба. Гентамицин делује бактерицидно тако што иреверзибилно инхибира синтезу протеина осетљивих микроорганизама. Еритромицин је антибиотик из групе макролида. Макролиди инхибирају синтезу протеина бактерије делујући на транслокацију. Термин макролид се односи на структуру – вишечлани лактонски прстен за који су везани један или више деокси шећера. Током четрдесетих година, еритромицин је био једини макролидни антибиотик коришћен у клиничкој пракси. Данас имамо на располагању бројне макролидне антибиотике и сродне лекове, али су

најважнији кларитромицин, телитромицин и азиетромицин. Антимикробни спектар еритромицина веома је сличан пеницилину и доказана је његова ефикасност и безбедност као замене, код пацијената осетљивих на пеницилин. Делује на Грам (+) бактерије и спирохете, али не и на већину Грам (-) микроорганизама, изузев гонокока (*Neisseria gonorrhoeae*) и у мањем степену хемофилуса (*Haemophilus influenzae*), микоплазми (*Mycoplasma pneumoniae*), легионела (*Legionella* sp.) и појединих хламидија. Резистенција се може јавити и последица је промене везног места за еритромицин на бактеријском рибозому, која се преноси плазмидима.

2.4. Резистенција патогених микроорганизама

Сам појам „резистенција“ бактерија на антибиотике значи неосетљивост или отпорност бактерија на антибиотике. Резистенција микроорганизама на антибиотике је последњих деценија у великом порасту. До 50-их година прошлог века научници су сматрали да је молекул ДНК изузетно стабилан и да гени немају могућност кретања ван генома по ћелији. Током педесетих година прошлог века дошло се до сазнања о постојању покретног генетичког материјала у скоро свим живим организмима. У основи, постоје 3 главне групе покретних генетичких елемената: транспозони, плазмиди и епизоми. Транспозони су делови молекула ДНК који се могу селити (транспозиција) са једног места у геному на друго. Код бактерија, транспозони се могу премештати с једног локуса на хромозому на други, из плазида на бактеријски хромозом или обрнуто, као и са плазида на плазмид. Плазмиди представљају екстрахромозомски генетски (наследни) материјал. Сматра се да су за стварање резистенције према антибиотцима нарочито важни плазмиди. За њих је карактеристично да се репликују независно од бактеријског хромозома. Већина плазида се састоји од двоструке ДНК, која је циркуларна, а може бити и линеарна. Сматра се да је стварање бактеријских Р-плазида вероватно последица акумулирања транспозона који кодирају отпорност на различите антибиотике на истом плазмиду (Voet и Voet, 2004). Наиме, Р-плазмиди на себи носе вишеструке гене за резистенцију према разним антимикробним лековима и тешким металима (нпр. арсен). Резистенција се најчешће јавља на сулфонамиде, стрептомицин, хлорамфеникол и тетрациклин. Бактерије могу бити резистентне на само један, али и на више њих. Најважније својство плазида је да се отпорност на антибиотике може преносити с резистентних

бактерија на нерезистентне, али и на оне који већ носе резистенцију на исте или различите антибиотике, стварајући тако вишеструку отпорност. Преношење плаزمиде може се обављати коњугацијом (која се врши код Грам (-) бактерија) и трансдукцијом (код Грам (+) бактерија). Плазмиде који се могу интегрисати у хромозом и репликовати се заједно са њим, називамо епизомима.

За развој оваквих резистентних сојева, тзв. *супербактерија*, нарочито плодно тло су болнице, због сталне и интензивне изложености бактерија еволуционом притиску бројних антибиотика. Болничке инфекције забележили су још стари Грци, а у новије вријеме јављују се код 5-6% примљених пацијената, с тим да је проценат виши код земаља у развоју, гдје су услови и хигијена лошији, а антибиотици се често неумерено употребљавају (Nester и сар., 2004). Најчешћи узрочници ових инфекција су бактерије *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.*, *umд*.

Постоји више различитих механизма отпорности микроорганизама према антибиотцима:

- Измена циљног места антимикробне активности антибиотика, што доводи до немогућности његовог деловања. Различити молекули који су места антимикробне активности антибиотика могу бити измењени мутацијом. Са тако измењеним молекулима антимикробно средство (антибиотик), не може да ступи у интеракцију. Та места, најчешће ензими, задржавају своју активност према супстрату, али постају неосетљиви на деловање антимикробног средства. Изоловане су бактерије које су постале резистентне на хиналонске и кумаринске антибиотике пошто је код њих дошло до мутације на генима одговорним за синтезу А и Б субјединица ензима ДНК гиразе, док се резистенција појединих бактерија (*Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium leprae*) на рифамицине испољава услед мутације на β -субјединици РНК полимеразе. Мутације које проузрокују резистентност на поједине антибиотике се дешавају и на нивоу протеина који везују пеницилин (РВР – peniciline binding proteins) (код β -лактамских антибиотика) и рибозома (код инхибитора синтезе протеина).

- Микроорганизам обезбеђује алтернативни систем контроле реакција којима замењује или допуњује онај систем који је инхибирао антибиотик. У овом случају се ензим инхибиран од стране антибиотика замењује другим ензимом који може да катализује исту реакцију, а неосетљив је на деловање датог антибиотика. Тај алтернативни ензим је кодиран генима који се налазе на плазмиду. Тако на пример,

бактерије које су резистентне да деловање триметоприма и сулфонамида производе дихидрофолну редуктазу неосетљиву на триметоприм и дихидроптероатну синтетазу отпорну на сулфонамиде.

- Непропустљивост ћелијских мембрана микроорганизма за антибиотик тако да он не може стићи до места на коме би испољио своју активност. Ћелијске мембране могу бити или могу постати непропустљиве на деловање неког антибиотика. Ћелијске мембране неких бактерија, нарочито Грам (-) бактерија (нпр. *Pseudomonas aeruginosa*), поседују природну непропустљивост за многе антибиотике. Њихова спољашња мембрана због своје структуре не пропушта антибиотик до његовог места деловања. Неке бактерије своју непропустљивост стичу мутацијом. Тако на пример, присуство плазида који детерминише резистенцију на терациклине у бактерији *E. coli*, омогућава синтезу протеина који се интегришу у цитоплазматску мембрану и спречавају транспорт тетрациклина у ћелију (Тописировић и Јовчић, 2013). Такође и ензими цитоплазматичне мембране могу изменити антибиотик на такав начин да он изгуби афинитет за место своје антимикуробне активности или долази до немогућности транспорта антибиотика до места његове антимикуробне активности, као што је случај код амногликозидних антибиотика, где се стварањем мутаната који инхибирају оксидативну фосфорилацију спречава транспорта аминокликозида у ћелију.

- Редукција потребе микроорганизама за метаболитом чију је продукцију инхибирао антибиотик. Микроорганизми се могу адаптирати на инсуфицијенцију метаболита чију је синтезу или функцију инхибирао неки антибиотик. Такође, неки микроорганизми имају способност да тај дефицитарни метаболит апсорбују из спољне средине. Ова способност објашњава делимично урођену резистентности неких бактерија на деловање неких антибиотика, нпр. β -лактамских антибиотика.

- Разградња или модификација антибиотика пре него што стигне до места своје активности. Ово је најефикаснији и најчешћи механизам стицања резистенције микроорганизама, нарочито код бактерија. У њиховим ћелијама се или синтетише ензим који ће извршити деградацију антибиотика на мање молекуле који немају антимикуробно деловање, или модификацију, аденилизацијом или фосфорилацијом NH_3 , $-\text{NH}_3\text{OH}$ или $-\text{OH}$ група антибиотика. Овај тип резистенције је нарочито важан за β -лактаме, аминокликозиде и хлорамфеникол. β -лактамазе су ензими који катализују хидролизу β -лактамског прстена β -лактамских антибиотика што доводи до стварања производа који не поседују инхибиторна својстава, односно губе способност да се вежу

за одређено место у ћелији (у овом случају за ПАБА-протеин). Инактивација аминогликозида настаје деловањем ензима који их модификују, као што је случај нпр. са канамицином код кога долази до инактивације аденилацијом канамицин нуклеотидилтрансферазом која катализује трансфер нулеотидне групе са нуклеозид трифосфата на 4' хидроксилну групу канамицина. Ензим хлорамфеникол ацетилтрансфераза инаktivира антибиотик хлорамфеникол вршећи ацетилацију уз коришћење ацетил-коензима А као донора ацетил- групе. До данас је описан већи број „cat“ гена који су распоређени на плазмидима који кодирају различите хлорамфеникол ацетилтрансферазе (Тописировић и Јовчић, 2013).

2.5. Биљке као потенцијални извор биоактивних супстанци

Употреба биљака за лечење болести сеже далеко у прошлост. Од давнина су људи увидели да поједине биљке поседују лековита својства и разликовали су их од штетних и опасних биљака. Та сазнања су преношена са генерације на генерацију стварајући на тај начин почетке народне, односно традиционалне медицине. Данас се многе биљке које су се користиле у народној медицини примењују у званичној медицини.

Први записи о употреби биљака у медицинске сврхе потичу од древних народа као што су Кинези, Индијци, Египћани, Грци и Римљани. Својим списима се истичу грчки лекар Хипократ (од око 460 - до око 370. г.п.н.е.), Диоскорид (40-90. год.) грчки лекар и ботаничар који је написао знаменито дело "De materia medica", Гален (129-210. год) који је проучио справљање лекова од лековитих биљака, тј. процес екстракције лековитих биљака, па су по њему ови екстракти добили назив "Галенски препарати". Његова сазнања су коришћена хиљадама година. У познијој историји људског рода, у средњем веку, примарну улогу у очувању сазнања о начинима лечења лековитим биљем и развоју народне медицине преузимају монаси у манастирима. Они се баве и узгајањем лековитих и ароматичних биљака. Након Француске револуције овом тематиком се баве Лавоазије, Шеле, Сертинер, итд (Петровић-Цековић, 2004).

Примена лековитих биљака у лечењу разних болести је дубоко укорењена у нашој народној медицини. Први писани документ датира још из XIV века (Ходошки кодекс), а најбитнији запис из тог периода представља Хиландарски медицински кодекс из XV и XVI века. Проучавањем биљака бавили су се многи истраживачи:

Захарије Стефановић Орфелин (Велики српски травник 1783), Јосиф Панчић (Ботаника - 1868-1873), Владан Ђорђевић (Народна медицина у Срба - 1872), Васа Пелагић (Народни учитељ), итд. (Петровић-Цековић, 2004).

Научна дисциплина која се бави проучавањем лековитих сировина пореклом из природе (дрогe) и њиховим лековитим састојцима назива се фармакогнозија. Појам "фармакогнозија" је први пут применио бечки лекар, професор и патолог Адам Шмит (1759-1809) у свом делу "Lehbruch der Materia Medica". У традиционалној медицини често се користи појам "фитотерапија" који представља облик традиционалне и конвенционалне медицине (Ковачевић, 2004). На основу симптома болести као терапијски агенси се користе биљне дроге, односно препарати израђени од њих. Могу се примењивати на основу сопствене одлуке пацијента или на препоруку лекара. Природни лекови могу да се користе самостално или удружено са синтетичким лековима. Да би терапија била адекватно и успешно примењена неопходно је поставити тачну дијагнозу, али је нужно и познавање одговарајућих дрога, односно фармаколошких својстава њихових састојака. Иако су мишљења стручњака у погледу традиционалне медицине често супротна, неоспорна је чињеница да лековите биљке могу бити допунско средство у лечењу неких болести, а често се традиционална медицина показала и ефикаснијом од метода које се користе у званичној медицини (De Smet, 1997). Предност једињења биљног порекла у односу на синтетичке лекове је у томе што биљке имају већи фармаколошки комплекс. Биљке се карактеришу мешавином различитих активних супстанци, а свака од њих има различит фармаколошки ефекат. На тај начин оне могу утицати на више различитих обољења за разлику од синтетичких лекова, који су направљени да инхибирају (или стимулишу) један од путева фармаколошких ефеката (Della Loggia, 2000). Велики број биљака још увек није истражен са фармаколошког аспекта, а свака биљна врста представља јединствен генетички потенцијал, односно, мноштво неистражених могућности (Јанчић, 2002).

Ароматичне биљке су извор етарских уља. То су лако испарљиве уљасте течности (изузетно чврсти и получврсти препарати) добијене из ароматичних биљака различитим физичким поступцима. Према неким ауторима, нарочито у Француској, под етарским уљима подразумевају се само производи добијени дестилацијом помоћу водене паре (Skala и сар., 1999; Китић, 2006). Етарска уља су комплексне смеше различитих хемијских једињења (у једном етарском уљу може се наћи и до 800

једињења). Доминантна група једињења етарског уља су терпени (монотерпени, дитерпени и сесквитерпени, као и њихови кисеонични деривати). Поред терпена, у етарским уљима могу се наћи и друга испарљива једињења: алифатични угљоводоници (нпр. додекан, тридекан, тетрадекан и њихови деривати), алкохоли (деканол, еугенол, сафрол), алдехиди (метилдодеканал), естри, метил-олеат и др.), једињења са ароматичном структуром (деривати бензоеве киселине, фенилпропаноиди, кумарини, миристицин, кониферилалкохол и апиол) и специфична једињења која садрже сумпор (најчешће изосулфоцијанати и органски дисулфиди) и азот (деривати индола или алифатични амини) (Китић, 2006). Етарска уља инхалирана или апликована на кожу у адекватној концентрацији делују као локални анестетици и аналгетици. Поред тога, бројна истраживања указују да се ова уља могу успешно примењивати и као лаксативи, имуномоделирајуће супстанце, код болести респираторних органа, у урологији, гастроентерологији и дерматологији. Доказано је да многа делују на централни нервни систем, повећавају циркулацију у мозгу, утичу на перцепцију, меморију и расположење. Експерименти су рађени на мишевима, пацовима и жабама - испитиван је утицај етарског уља на интестинални транспорт, ефекат продирања уља кроз кожу, скелетне мишиће, испитивана су и аналгетска својства уља. Многа етарска уља се могу узимати као превентива канцерогенезе (Galambosi и сар., 1999; Fogasa и сар., 1997; Audin и сар., 1996; Delgado и сар., 1996). Антивирусна активност етарског уља *Houttuynia cordata* је тестирана на херпес симплекс вирус, вирус инфлуенце и ХИВ-132. Претпостављено је да етарско уље може спречити развој вируса. Доказано је да етарска уља неколико биљних врста рода *Heracleum* релативно успешно, дејствују на вирус грипа (Tkachenko и сар., 1995). Каснија истраживања наводе на закључак да етарска уља, и то, пре свега, сесквитерпени, повећавају бактерицидно дејство антибиотика. Наиме, они сматрају да ова једињења изазивају промене у мембрани микроорганизама, што омогућава антибиотику да брже продре у унутрашњост микроорганизама и брже делује. У ту сврху анализирали су утицај неролидола, бисаболола, апритона и фарнезола на *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Установљено је да и милимоларне концентрације ових једињења повећавају активност антибиотика, а да је неролидол је био најефикаснији сесквитерпен (Brem-Stecher и Johnson, 2003).

2.6. Опште карактеристике одабраних биљних врста

2.6.1. Опште карактеристике врсте *Angelica sylvestris* L. (Fam. Apiaceae)

Angelica sylvestris (Слика 2-1) је двогодишња до вишегодишња, зељаста биљка са вретенастим, дебелим, разгранатим ризомом. Стабљика је висине од 50-150 cm, али може да достигне висину и до 2 m. Стабљика је усправна, округла, избраздана, шупља, гола или само испод шцвасти длакава, у горњем делу разграната. Листови су затворено зелене боје, 2-3 пута перасто дељени. Доњи листови су до 60 cm дугачки. Одликују их изразито шупље и дугачке лисне дршке, које су на попречном пресеку полумесечасте. Горњи листови су ситнији и слабије дељени, седећи са рукавцем. Лисни рукавци су веома изражени, голи. Режњеви последњег реда су на кратким дршкама, дуги 2,5-9 cm, широки око 1 cm, елиптични, на врху шиљати или кратко зашиљени, по ободу ситно тестерасте, мање више голи. Бочни режњеви листова понекад дводелни. При основи режењева првог реда понекад се налазе мали листолики сегменти. Сложене штитасте цвасти су обично веома крупне, са 20-30 зракова цвасти који носе ситније, просте штитасте цвасти (штитићи). Штитићи су састављени из већег броја цветова. Инволукрума нема или је састављен од 1-3 листића који рано опадају. Инволуцелум је од већег броја линеарно-ланцетастих сегмената, по ободу трепавичаво длакавих. Чашица је без јако изражених зубаца. Крунични листићи су бело ружичасти или ружичасто црвени, ланцетасте или елиптичне. Плод је широко елипсоидног облика, дужине 3,5-5 mm. Стубићи на стилоподијуму су унатраг савијени. Плодићи (мерикарпијуми) су на попречном пресеку пљоснати, са 3 слабије истакнута и 2 широко крилата ребра. Бразде плода поседују појединачне канале испуњене етарским уљем. На вентралној страни плода се налазе по 2-4 канала. Цвета VII-VIII месеца.

Станиште: Расте у светлим и влажним шумама, на влажним шумским пропланцима и шикарама на обалама потока и река и влажним ливадама. Јавља се од низијских подручја до скоро 1000 m надморске висине.

Опште распрострањење: Европа, посебно њени централни и северни делови, Мала Азија, Кавказ и Сибир.

Примена у традиционалној медицини: Фармаколошка својства биљне врсте *A. sylvestris* су још увек у фази испитивања, али се у народној медицини користи у исту сврху као и *A. archangelica* (Туцаков, 1997), па се стога њена примена може наћи

у третману бронхитиса, астме, грипа и других болести респираторног, васкуларног и дигестивног тракта (Асенов и сар., 1998; Тасић и сар., 2004).

Подаци о фитохемијским својствима: У ранијим студијама које су се бавиле хемијским саставом етарског уља *A. sylvestris* утврђен је висок проценат α -пинена (24,65%) и β -феландрена (42,96%) у надземним деловима биљака (Evergetis и сар., 2012) и трицикличног хамазулена у корену биљке (Vinokurova и сар., 1999). У анализи етарског уља из плодова врсте *A. sylvestris*, у зависности од метода његовог изоловања детектовано је присуство α -пинена (25,6%, 36,2% и 9,2%), β -феландрена (9,1%, 9,9% и 3,2%), борнил ацетата (7,3%, 4,3% и 6,9%) и лимонена (5,6%, 4,3% и 2,1%) (Ozek и сар., 2008)

Подаци о антимикуробној активности: Антимикуробна активност екстракта *A. sylvestris* је испитивана и против биљних патогена (*Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas glycinea*) (Брковић и сар., 2006) и против патогена из хуманог материјала (*E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* (МРСА) (Sarker и сар., 2003).



Slika 2-1. *Angelica sylvestris* L, станиште у Сићевачкој клисури.

У овој докторској дисертацији су представљени први подаци о антимикуробном деловању етарског уља и о антиоксидативној активности етарских уља и метанолних

екстракта надземних делова *A. sylvestris*. Подаци су публиковани у радовима Станковић и сар. (2015) и Станковић и сар. (2016).

2.6.2. Опште карактеристике врсте *Angelica pancicii* Vand. (Fam. Apiaceae)

Angelica pancicii (Слика 2-2) је изразито крупна, вишегодишња, зељаста биљка. Ризом је дебљине 1,5-3,5 cm, вретенаст, вертикалан или пузећи, попречно набран у горњем делу, тамнобраон до црне боје. Бочни коренови вретенасти, задебљали до танки, скоро кончасти. Стабло је високо 80-200 cm, дебљине 1,5-3,5 cm, у доњем делу нејасно, а у гоњем јасно ребрасто избраздано, шупље, у горњој половини разгранато. У свом горњем делу, стабло често поседује љубичасту превлаку по површини. Листови су на 4-12 cm дугим дршкама, јајаст, просто до двојно перасто дељени, са крупним јајастим, веома надувеним рукавцима. Рукавци су по нервима обрасли хрскавичастим папилама неједнаке дебљине или голи. Главни режњеви листа (3-7) су округласти или јајаст, крајњи 4-9 cm дуги и 1,8-2,5 cm широки, јајаст, неравномерно на зубљени. Цвасти у виду крупних, сложених штитова или сферичног облика. Главни штитови су састављени од 40-80 мањих цвасти (секундарни штитови) које су постављене на неједнаким 1,5-3,5 cm дугим дршкама. Зраци главне цвасти се до три пута издужују у плоду, обрубљене су и прекривене густим, ситним папилама. Поседују инволукрум састављен од 1-4, тесно ланцетасти опадајућа, опнаста, на ободу права листића. Листићи инволукрума су 1,8-4,5 mm дуги и 0,8-1,0 mm широки. Секундарни штитови су грађени од 20-60 цветова, брактеје опнасте, има их 8-12. Брактеје су 1,5-3,5 mm дуге и 0,5-0,8 mm широке, ланцетасти, на врху заострене, голе или са ретким папилама по површини. Цветне дршке су 1,5-3,5 mm дугачке, код плода се до три пута издужују, прекривене су папилама. Цветови су 15-18 mm у дијаметру. Крунични листићи 1,0-1,5 mm дуги и 0,6-0,8 mm широки, клинасто су повијени унатраг, беле или бледорозе боје, са једним нервом у средини. Плодови широко елипсоидни, снажно спљоштени, голи. Мерикарпијуми су 3,5-7,0 mm дуги, 2,5-4,0 mm широки, са 3 паралелна јаче изражена ребра и 4 плитке бразде по спољној страни. Бочна ребра опнасто-крилата, крила са кратким ушатим проширењима на оба краја, са унутрашње стране са два пљосната, слабо развијена издужена ребра и 3 бразде. У плоду су присутна 3-4 уљна канала. Силоподијум има неправилан облик. Цвета VII-VIII месеца.

Станиште: Расте поред планинских потока и река, по ободу тресетишта и на другим влажним местима. Распрострањена у планинском и високопланинском појасу, од 750 до 2000 m надморске висине.

Опште распрострањење: Бугарска, Македонија и Србија. Ендемит Балканског полуострва.

Примена у традиционалној медицини: Као и код биљне врсте *A. sylvestris*, фармаколошка својства *A. panicicii* нису довољно испитана, али и ова врста има сличну примену (лечење бронхитиса, астме, грипа и других болести респираторног, васкуларног и дигестивног тракта) (Асенов и сар., 1998; Тасић и сар., 2004).

Подаци о фитохемијским својствима: Хемијски састав *A. panicicii* је први пут описан у раду Симоновић и сар. (2014), при чему су као доминатне компоненте детектовани β -феландрен (54,9% и 60,1%), α -пинен (14,5% и 20,1%) и α -феландрен (4,5% и 4,3%).

У овој дисертацији су презентовани први објављени подаци о антимикумној и антиоксидативној активности етарског уља и метанолних екстраката врсте *A. panicicii*. Подаци су публиковани у радовима Станковић и сар. (2015) и Станковић и сар. (2016).



Slika 2-2. *Angelica panicicii* Vand., станиште на Власинској восоравни.

2.6.3. Опште карактеристике врсте *Laserpitium latifolium* L. (Fam. Apiaceae)

Laserpitium latifolium (Слика 2-3) је вишегодишња биљка са великим, местимично задебљалим ризомом на чијем се горњем крају налазе кончасти остаци старих листова. Стабљика је усправна, висине 60-150 cm, највећим делом гола, округла, танко избраздана, у горњем делу разграната. Доњи листови врло крупни, на дршкама, троструко перасто дељени. Режњеви последњег реда су крупни, дужине 3-10 cm, ширине 2-6 cm, најчешће широко јајстог облика, тупи, при основи готово срцасти, по ободу крупно тестерасте. Горњи листови су седећи, са издуженим рукавцем и ужим режњевима, често на врху са по три листића. Сви листови су голи, а лисне дршке су кратко длакаве. Штитасте цвасти су велике, састављене од 20-30 зракова који су у доњем делу храпави. Штитићи су са већим бројем цветова, на реалтивно дугачким дршкама главне цвасти Инволукрум је састављен из већег броја линеарних или линеарно-ланцетастих, голих листића. Листићи инволуцелума су линеарни до скоро кончасти. Зупци чашице су делимично истакнути, шиљати. Крунични листићи су бели или пурпурни, дужине 2-2,5 mm, ширине 1,5-2 mm, обрнуто јајасти, при основи мање више клинасти. Плод је проширено елипсоидног облика, дужине 8-9 mm, ширине 3-7 mm, са широко крилатим споредним ребрима. Бочна ребра са крилима једнаким ширини плода.

Станиште: Расте на камењарима са слабо развијеном вегетацијом, у шикарама, сувим и светлим листопадним шумама, на степоликим ливадама, најчешће на кречњаку, гранитним и базалтним стенама планинског појаса.

Опште распрострањење: Европа, Средоземље и Мала Азија.

Примена у традиционалној медицини: Употреба биљне врсте *L. latifolium* није још довољно истражена у фармаколошком смислу. У Бугарској се корен ове биљке користи као диуретик и лаксатив, а плодови се примењују у регулисању апетита и као дигестив (Asenov, 1982).

Подаци о фитохемијским својствима: У једном од малобројних објављених радова анализирана су етарска уља изолована из подземних органа и плодова *L. latifolium* и *L. ochridanum*, као и из хербе *L. ochridanum* (Поповић и сар., 2015). Као и у нашим резултатима (сабинен 47,8% и α -пинен 25,0%), у уљима доминирају монотерпени, а доминатне компонентне су биле: α -пинен и сабинен (44,0% и 26,8%) у уљу плода *L. latifolium*, α -пинен (44,4%) у уљу подземних органа *L. latifolium* и

лимонен (57,7%) у уљу плода *L. ochridanum*. У уљу поземних органа *L. ochridanum* удео монотерпена и сесквитерпена је приближан (α -пинен 44,4%, хамазулен 14,9%, α -бисаболол 10,3%). Резултати који се односе на хемијски састав испитиваног узорка *L. latifolium* презентовани су у раду Митић и сар. (2015).

Подаци о антимикуробној активности: Поповић и сарадници (2015) су приказали и резултате добијене испитивањем антимикуробне активности *L. latifolium* и *L. ochridanum*. Испитивана је антимикуробна активност етарских уља ове две врсте биљака, микродилуционом методом, против *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* и два соја *C. albicans*. Етарско уље подземних органа *L. ochridanum*, као и уља плодова обе врсте *Laserpitium* показала су активност према сојевима *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* (MIC 13,03-73,00 $\mu\text{g/ml}$), док је етарско уље подземних органа *L. latifolium* показало слабу антибактеријску и антифунгалну активност пошто су вредности MIC биле преко 100 $\mu\text{g/ml}$.

У прегледаној литаратури нисмо дошли до података о антибактеријском деловању метанолних екстраката биљне врсте *L. latifolium*, тако да можемо сматрати да су у овој студији приказани први подаци о антибактеријској активности метанолних екстраката *L. latifolium*. Такође, по први пут су представљени подаци о антиоксидативној активности етарских уља и метанолних екстраката *L. latifolium*. Подаци су публиковани у радовима Станковић и сар. (2015) и Станковић и сар. (2016).



Slika 2-3. *Laserpitium latifolium* L.

2.6.4. Опште карактеристике врсте *Hyssopus officinalis* L. (Fam. Lamiaceae)

Hyssopus officinalis (Слика 2-4) је вишегодишња биљка, са формом полужбуна. Стабло је у базалном делу одрвењено, разгранато. Гране су многобројне, делимично полегле или потпуно усправне, висине 20-60 (80) cm, дебљине 2-4 mm, покривене танком, мрком кором. Изданци презимљују, покривени су кратким маљама или сомотастим длакама, ређе су голи, бледо зелени, са многобројним утиснутим жлездама, оштрог ароматичног мириса. Са нодуса стабла полазе или дугачке бочне гране са цвастима или стерилни лисни изданци. Листови скоро седећи, ланцетасти до линеарно ланцетасти, дугачки 1-3 (4) cm, широки 2-8 (10) mm, на врху већином шиљати или кратко заобљени. По ободу су неназубљени, благо уздужно увијени, чврсти, кожасти, без истакнутих бочних нерава, на лицу сјајни, са обе стране густо покривени жлезданим длакама. Цветови неправилно двоуснати, дугачки 8-12 mm, са кратким усправним цветним дршкама, по 3-9 сложени у дихазијалне цвасти, у пазуху горњих листова. Сви заједно граде на врху грана густе, на једну страну орјентисане, при основи често искидане, класолике цвасти дугачке 2-10 (15) cm. Чашица је цеваста, густо покривена маљама, често љубичаста. Чашична цев је права, дугачка 3-5 mm, са 15 нерава, ждрело чашице је голо. Чашичних зубаца је 5. Круница је већином љубичаста или плава, ређе ружичаста или бела, грађена од 5, највећим делом сраслих листића. Горња усна крунице је врло кратка, скоро права, јајаста, на врху усечена, споља покривена кратким длакама. Доња је најмање дупло дужа, трорежњевита. Средњи режањ је широк, на врху усечен и назубљен. Цвет садржи 4 прашника, при чему су предњи прашници само мало дужи од унутрашњих, сви јако избачени изван крунице. Стубић је дужи од прашника. Плодићи (орашице) су јајасто-четвороугласти, дугачки око 2 mm, глатки, мрке боје. Цвета VII-VIII месеца.

Станиште: Расте се на сушним, јако осунчаним стенама, на сиромашним сувим пашњацима, пре свега на кречњачкој подлози.

Опште распрострањење: Централна, јужна и југоисточна Европа, Медитеран, Кавказ, централна Азија и Мала Азија.

Примена у традиционалној медицини: *Hyssopus officinalis* представља добро познату биљку која има антимикробне, антивирусне, карминативне и благо спазмолитичне ефекте. У народној медицини, надземни делови биљке се користе код

хроничног бронхитиса и астме, а делује и као антисептик (Туцаков, 1997; Тасић и сар., 2004).

Подаци о фитохемијским својствима: Више аутора је представило резултате испитивања хемијског састава биљне врсте *H. officinalis*. Изопинокамфон, присутан у нашем узорку са великим уделом (22,7%), се налази и у раније истраживаним узорцима етарског уља *H. officinalis* са локалитета у Италији, Ирану и Турској (43,3% 57,27% и 22,1%) (Mazzanti и сар., 1998; Kizil и сар., 2010; Mahboubi и сар., 2011). С друге стране, пинокамфон који је у ранијим истраживањима детектован у великом проценту (44,4%), као и варијетети цис – пинокамфон (42,5%) и транс – пинокамфон (14,1%) (Mazzanti и сар., 1998, Митић, Ђорђевић, 2000) у нашем уљу нису били присутни. Најприсутнија компонента у нашем узорку, 1,8-цинеол (49,1%) је била детектована само у узорку *H. officinalis* var. *decumbens* са локалитета у Француској (12,3 %) (Mazzanti и сар., 1998). Описано је и етарско уље *H. officinalis* са специфичним саставом: тимол (18,95%), β-бисаболол (10,62%), карвакрол (7,73%), н-додекан (5,23%), кариофилен (4,96%), орто-ацетанизол (4,72%), камфор (3,47%), кумин алдехид (3,22%) и спатуленол (3,02%) (Dehghanzadeh и сар., 2012).

Етарско уље биљне врсте *Hyssopus officinalis* прикупљене на терену у југоисточној Анадолији, Турска, је показало слабу антиоксидативну активност (Kizil и сар., 2010). Фитохемијска студија надземних делова *H. officinalis* пореклом из Кине довела је до изолације два нова и девет од раније познатих флавоноида. Антирадикалска активност ових компоненти одређена је DPPH методом. Утврђено је да испитиване компоненте поседују битну антирадикалску активност (Wang и Yang, 2010). Ебрахимзадех и сарадници (2010) су користили шест различитих *in vitro* метода за утврђивање антирадикалских и антиоксидативних својстава метанолних екстраката надземних делова *H. officinalis* L. var. *angustifolius*. Испитивани екстракти су показали антиоксидативну активност у распону од средње до јаке (Ebrahimzadeh и сар., 2010). Антиоксидативна активност етанолних екстраката цветова, листова и стабљика *H. officinalis* var. *angustifolius* била је испитивана различитим *in vitro* методима (Alinezhad и сар., 2013). Екстракти су показали добру антиоксидативну активност. IC₅₀ код DPPH теста је био 148,8 µg/mL код цветова, 79,9 µg/mL код стабљика и 208,2 µg/mL код листова. Сви екстракти су показали средњу Fe²⁺ хелатну способност. Лудмила и Виера (2005) оцењивали су антирадикалну активност и редукциону моћ екстраката врсте *H. officinalis* при чему су екстракти су имали високу активност по оба испитивана

критеријума (Ludmila и Viera, 2005). Осим тога, од фенолних киселина, гална киселина се показала као најактивнија компонента у везивању слободних радикала, а кофеинска киселина је имала највећу редукциону моћ. Метанолни екстракти *H. officinalis* су имали богату разноврсност фенолних компонената, нарочито у хлорогенском, протокатехинском, ферулинском, сиригинском, п-хидроксибензојевом и кофеинском киселином, а затим и ванилинском, п-кумаринском, рузмаринском и гентисинском киселином (Murakami и сар., 1998; Varga и сар., 1998; Kochan и сар., 1999; Zgorka и Głowniak, 2001).

Подаци о антимикробној активности: Неколико студија се бавило испитивањем антимикробне активности врсте *H. officinalis*, на основу који се дошло до закључка да хемотипови одређују антимикробну активност етарских уља ове биљне врсте. Хемотип популација са локалитета у Ирану који је садржао камфор (10,3%–53,3%) и хризантенил ацетат (4,3%–22,5%) је антибактеријски деловао слабо или уопште није деловао (Dehghanzadeh и сар., 2012). Други хемотип популација са локалитета у Турској, Италији и Ирану који је садржао изопинокамфопинон (39,3%), пинокамфон (44,4%) и изопинокамфон (57,27; 22,1 и 43,4%) је показао значајну антибактеријску активност (Kizil и сар., 2010; Mazzanti и сар., 1998; Mahboubi и сар., 2011). Трећи хемотип популација са локалитета у Француској и Италији (*H. officinalis* var. *decumbens*), је садржао у највећем проценту линалол (51,7%) и имао је бољу активност од остала два хемотипа (Mazzanti и сар., 1998). Kizil и сар. (2010) су у испитивању антимикробног деловања уља *H. officinalis* користили диск дифузиони метод са по 5 и 10 µL уља против сојева *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes* и *C. albicans*. Утврдили су јако антимикробно деловање против сојева *S. pyogenes*, *S. aureus*, *C. albicans* и *E. coli*, али није детектовано никакво деловање против соја *P. aeruginosa* (Kizil и сар., 2010). Mazzanti и сар. (1998) су испитивали антимикробно деловање етарских уља *H. officinalis* и *H. officinalis* var. *decumbens* микродилуционом и диск дифузионом методом против бактеријских сојева *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *K. oxytoca*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Pseudomonas* spp., и два соја *Salmonella* spp., као и против седам сојева *Candida albicans*, *C. krusei* и *C. tropicalis*. Етарско уље *H. officinalis* је показало занемарљиво антимикробно деловање код свих сојева, док је var. *decumbens* деловао само у пар случајева (*Enterococcus* spp., *E. coli*). Оба испитивана уља су показала јако инхибиторно деловање против свих сојева рода *Candida*. Сматра се да линалол и 1,8-цинеол, могу да допринесу већој антимикробној активности *H. officinalis*

var. decumbens код бактерија, док је лимонен заслужан за антимиотично деловање против сојева рода *Candida* у оба случаја (Mazzanti и сар., 1998). Коришћењем диск дифузионе и микродилуционе методе вршено је тестирање антимиотичног деловања етарског уља *H. officinalis* против различитих микроорганизама. Уље је показало значајну антимиотичну активност против Грам (+) бактерија, као и против фунгалних сојева (Mahboubi и сар., 2011). Dehghanzadeh и сар. (2012) су истраживали антимиотично деловање етарског уља *H. officinalis* против следећих микроорганизама (*S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* sp., *B. subtilis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Acidovorax* sp., *Erwinia amylovora*, *Streptomyces scabies*, *P. fluorescens*), користећи микродилуциону и диск дифузиону методу. Уље је показало јако антибактеријско деловање против *Erwinia amylovora* и *Klebsiella* sp., док против осталих патогена није деловало (Dehghanzadeh и сар., 2012).

Антимиотично деловање метанолних екстраката *H. officinalis* је испитивано и публиковано у радовима аутора Ozer и сар. (2006) и Proestos и сар. (2005), а само у случају испитивања Shinwari и сар. (2009) је забележан значајан резултат када је метанолни екстракт *H. officinalis* приказао антимиотичну активност против соја *P. aeruginosa* који је био резистентан на деловање антибиотика хлорамфеникола.



Слика 2-4. *Hyssopus officinalis* L.

2.6.5. Опште карактеристике врсте *Artemisia abinthium* L. (Fam. Asteraceae)

Artemisia abinthium (Слика 2-5) је вишегодишња, полужбунаста биљка, висока 60-120 cm, са одрвенелим и јако гранатим ризомом и бројним стерилним изданцима.

Стабљика је усправна, свозелена до сивобела, са много листова, густо длакава, разграната. Листови су са обе стране густо бело длакави. Приземни листови су 6-9 cm дуги и 3-7 cm широки, са дугачким дршкама које носе двоструко до троструко перасто дељене лисне плоче. Одозго сивозелени, одоздо сивобели, као и стабло са бројним жлезданим длакама. Листови стабла су са кратком дршком или седећи, урезани или до 2 пута перасто дељени, режњеви дугуљасто ланцетасти, кратко ушиљени. На врху стабла и бочних грана налазе се сложене, релативно крупне метличасте цвасти, састављене од великог броја полусферичних до јајастих главичастих цвасти. Главиче (капитулуми) су 2,5-3,5 mm у пречнику, могобројне, висеће, на кратким дршкама, у основи са троделним или целим ланцетастим бочним листићима. Листићи инволукрума су распоређени у два реда, сиво свиласто длакави по пвршини, на врху заобљени. Спољашњи листићи су скоро линеарни, са горње стране длакави, сивобели. Унутрашњи су широки, тупи, јајасте, са танким, кожастим ободом. Цветна ложка је прекривена длакама. Цветови су жути, са седећим жлездама, сви цвасти и фертилни. Средишњи цветови су двополни, ободни женски, са жиговима који знатно надмашују дужину крунице. Плод је ахенија, благо спљоштена, гола, дугачка око 1,5 mm. Цвета VI-IX месеца.

Станиште: Расте на рудералним стаништима, у селима и на периферији градских средина. Најчешће се среће поред путева, у парлозима, на старим зидинама, али насељава и песковита, ређе стеновита места.

Опште распрострање: Европа, Азија и подручје северне Африке. Врста је интродукована у Северну Америку и на Нови Зеланд.

Примена у традиционалној медицини: Биљна врста *A. absinthium* се у традиционалној медицини користи као средство за стимулисање апетита, као холагогик, холеретик, карминатив и стомахик (Тасић и сар., 2004). Такође, показује и антиинфламаторне и антихелминтичне ефекте и има употребу у лечењу рана и екцема (Асенов и сар., 1998).

Подаци о фитохемијским својствима: Хемијски састав етарског уља *A. absinthium* је испитиван од стране неколико истраживача. На основу досадашњих истраживања доказано је да хемијски састав етарског уља *A. absinthium* варира у односу на поднебље на коме расте. Тако је у обимној студији која се бавила испитивањем хемијског састава уља *A. absinthium* са различитих географских подручја у Европи уочено да су главне компоненте у уљима из Естоније били монотерпени

(сабинен и мирцен – 21,2% и 25,6%), као и у Мађарској, Шкотској, Молдавији (сабинен и мирцен – 9,2 и 38,9%), док је велика концентрација епоксидимена (22,1%) пронађена у узорцима из Русије (Orav и сар., 2006). Чиалва са сарадницима (1983) је дефинисао неколико карактеристичних хемотипова уља *A. absinthium* која расте на различитим локалитетима у Европи: уља богата сабинином и мирценом, уља богата α - и β -тујоном, уља богата епоксидименом и уља богата (*E*)-сабинил ацетатом. Такође су пронађене и неке мешавине ових хемотипова (Chialva и сар., 1983). У новије време су представљени нови хемотипови етарског уља *A. absinthium*: сабинил ацетат + тујони и сабинил ацетат + (3)-епоксидимен из Литваније (Judzentiene и сар., 2012); сабинен + мирцен + хризантенил ацетат из Турске (Baykan Erel и сар., 2012); β -пинен + β -тујон (Rezaeinodehi и Khangholi, 2008); (3)-епоксидимен + хризантенил ацетат из Француске и β -тујон + (3)-епоксидимен из Хрватске (Juteau и сар., 2003); чист β -тујон хемотип и β -тујон + цис-епоксидимен хемотип (Благојевић и сар., 2006) и сабинен + α -феландрен + сабинил ацетат (Михајилов-Крстев и сар., 2014) из Србије. У истраживањима уља из узорака са локалитета у Индији као главне компоненте уља су детектоване борнеол + метил хинокиат + изоборнил ацетат + β -гурјунен + кариофилен оксид (Rajesh, 2013).

Досадашњи резултати о антиоксидативној активности етарског уља *A. absinthium* су представљени у раду Михајилов-Крстев и сарадници (2014), где је помоћу ABTS и DPPH теста утврђена значајна антиоксидативна активност уља ове биљне врсте.

Подаци о антимикробној активности: Антимикробна активност етарског уља *A. absinthium* прочавана је у више истраживања. Baykan Erel са сарадницима (2012) је користећи диск дифузиони метод, дошао до резултата према којима узорак уља који су они тестирали није показао антимикробну активност против соја *P. aeruginosa*, док је солидно деловало на сојеве *S. aureus* и *C. albicans*. Изражено антимикробно деловање показало је етарско уље пелина дестиловано из биљака са два локалитета у Србији (Мокра и обала Нишаве) (Благојевић и сар., 2006). Уља са оба локалитета су испитивана диск дифузионим методом и при томе су приказала веома изражен инхибиторни ефекат према тестираним микоорганизмима (*E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. niger*), при чему је уље биљака са обале Нишаве показало незнатно јачу активност против свих микоорганизама, осим у случају *E. coli* и *S. aureus*. У истраживању Juteau и сарадника (2003), течно дифузионом

методом је испитивана антимикробна активност етарског уља пелина пореклом из Француске с обзиром да оно није садржало тујоне као уље пореклом из Хрватске. Претпоставља се да је управо недостатак тујона разлог потпуног недостатка антибактеријског деловања овог уља против *E. coli*, *S. aureus* и *Enterococcus hurae*, док је показало одређено инхибиторно деловање против *C. albicans* и *S.cerevisuae* var. *chevalueri*.

Антибактеријска активност метанолних екстраката *A. absinthium* презентована је у раду Baykan Erel и сар. (2012). Детектована је активност против *E. coli* и *P.aeruginosa*, док против осталих тестираних сојева (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *Enterobacter cloacae*) екстракти нису деловали. Међутим, у једној студији је презентована добра активност метанолних екстраката, у неким случајевима (против сојева *K. pneumoniae* и *E. coli*) они су се показали јачим од референтних антибиотика (Sengul i сар., 2011).

У доступној литератури нису нађени подаци о антиоксидативној активности метанолних екстраката *A. absinthium*, тако да су резултати презентовани у овој дисертацији први који се тичу ове врсте активности биљне врсте *A. absinthium*. Подаци су публиковани у радовима Станковић и сар. (2015) и Станковић и сар. (2016).



Slika 2-5. *Artemisia abinthium* L., на станишту код Нишке Бање

2.6.6. Опште карактеристике врсте *Achillea grandifolia* Friv.(Fam.Asteraceae)

Achillea grandifolia (Слика 2-6) је вишегодишња биљка, са скраћеним, пузећим ризомом. Стабљика је једноставна, висине 40-100 cm, проста или само на врху разграната, прекривена смеђим или сивим простим длакама, обрасла листовима до врха. Листови су релативно крупни, прекривени простим прилеглим и жлезданим длакама. Они су јајасто издужени, дубоко урезани до перасто дељени, са обе стране са по 4-8 режњева. Режњеви клинасто ланцетасти, зупчасти, спуштају се низ рахис лисне плоче. Главице (капитулума) многобројне (80-150), распоређене на врху главног стабла или на огранцима. Широке су 3-5 mm, у бази конусно сужене, прекривене простим и жлезданим длакама и организоване у густе гроњасте цвасти. Листићи инволукрума длакави, бледо зелени, са отворено смеђим, танким обрубом. Појединачни сегменти инволукрума су тесни, елиптичног до ланцетастог облика. Језичасти, периферни цветови су беле боје, малобројни (4-5), 1,2-1,5 mm дугачки, на врху са три нејасна зупца. Унутрашњи цветови су многобројни, цилиндрични, на врху проширени, као и остали делови цвасти, са жлезданим трихомима. Цветна лока је полулоптаста до благо конично испупчена, са мрежастом површином. Плод је ахенија, обрнуто јајастог до елиптичног облика, смеђа, 1-1,2 mm дугачка. Цвета V-VIII месеца.

Станиште: Засењена, стеновита, умерено влажна до сува места у шумама планинског и брдског региона. Честа међу блоковима стена у шумама.

Опште распрострањење: Настањује централне и јужне делове Балканског полуострва (Албанија, Бугарска, Грчка, Македонија, Србија) и западни део Мале Азије.

Примена у традиционалној медицини: Етарско уље *A. grandifolia* није често у употреби у традиционалној медици, али на основу проучавања хемијског састава уља, сазнајемо да у једињења присутна у њему имају доказана антихелминтична и јака антимикробна својства (Радуловић и сар., 2010). Оно се у народу употребљава на сличан начин као и код *A. millefolium*: у лечењу различитих проблема гастроинтестиналног тракта, за побољшање апетита, за спољну употребу као антисептик, као и код упала.

Подаци о фитохемијским својствима: Хемијским саставом етарског уља биљне врсте *Achillea grandifolia* бавили су се Suleimenov и сар., (2001) и Радуловић и сар., (2010). Етарско уље *A. grandifolia* пореклом из Казахстана као најактивније супстанце је имало β -пинен (8,9%), селин-11-ен-4а-ол (8,5%), и γ -еудесмол (6,3%)

(Suleimenov и сар., 2001), док је уље пореклом из Србије имало другачији састав (аскаридол 15,5%, α -тујон 7,5%, камфор 15,6%, борнеол 5,2% и (3)-јасмон 6,4%) (Радуловић и сар., 2010).

У ранијој студији, Павловић и сар. (2008), су користећи DPPH тест испитивали етарско уље *Achillea grandifolia* пореклом из југоисточне Србије (Сићевачка клисура) које је показало антирадикалну активност са вредношћу SC_{50} од 6 μ L/mL.

Пошто у доступној литератури нисмо дошли до података о антиоксидативној активности метанолних екстраката биљне врсте *A. grandifolia*, као и о антибактеријском деловању етарског уља и метанолних екстраката исте врсте, можемо сматрати да су ово први објављени подаци о антиоксидативној активности *A. grandifolia*. Подаци су публиковани у радовима Станковић и сар. (2015) и Станковић и сар. (2016).



Slika 2-6. *Achillea grandifolia* Friv.

2.6.7. Опште карактеристике врсте *Achillea crithmifolia* W.K. (Fam.Asteraceae)

Achillea crithmifolia (Слика 2-7) је вишегодишња, зељаста биљка, висока 25-50 cm, са одрвенелим, вертикалним или косим, разгранатим ризомом, без столона. Стабљика је усправна до полегла, једноставна или граната, 20-40 (60) cm висока, са много листова, мање или више прекривена дугим простим длакама или гола. Листови су обично вунасто длакави или голи, са бројним жлезданим длакама, дугуљасти или ланцетастии. Приземни листови су на јасним дршкама, ситно, двоструко перасто дељени са линеарним до ланцетастим режњевима, шири од стаблових. Листови стабла су

густо, двојно перасто дељени, режњеви благо размакнути, на врху ушиљени, по ободу нејасно назубљени. Лисна оса је уско окриљена, крилаца су 0,5-1,5 mm широка, целог обода. Горњи листови стабла ситнији, урезано до просто дељени. Основне, главичасте цвасти многобројне (50-150). Оне су 3-4 mm у пречнику, сакупљене на врху стабљика у сложене штитолике (гроњасте) свасти. Листићи инволукрума су елиптични, голи или слабо длакави, жутозелени, при врху отворено смеђи, са полупровидним кожастим маргинама. Ободних, језичастих цветова 4-6, они су 1,6-1,8 mm дугачки, са горње стране бели или чешће бледожућкасти, одоздо бели, упола краћи до скоро једнаки са инволуккрумом. Централни цветови цвасти, далеко ситнији од језичастих, такође малобројни, жути. Плод ахенија, издужена, елиптична до јајаста, смеђа, око 1 mm дугачка са тесним крилатим рубом. Цвета V-VIII месеца.

Станиште: Сушна каменита места и суви степолики пашњаци на кречњаку и силикату, степолика станишта и ксерофилне шуме.

Опште распрострањење: Балканско полуострво и средња Европа (Мађарска, Румунија и Словачка) и Мала Азија.

Примена у традиционалној медицини: *Achillea crithmifolia* се у народу употребљава на исти начин као и *Achillea millefolium*: у лечењу различитих проблема гастроинтестиналног тракта, за побољшање апетита, за спољну употребу као антисептик, као и код упала. Надземни делови хајдучке траве (*Millefolii herba*), традиционално се користе у виду финог праха за брзо зацељивање рана (Туцаков, 1997), а у пресованом стању за лечење кожних чирева, отворених рана, екцема и отока (Asenov i сар., 1998).

Подаци о фитохемијским својствима: Хемијски састав етарског уља врсте *Achillea crithmifolia* је, заједно са врстама *A. nobilis* или *A. millefolium*, је раније испитиван од стране неких истраживача (Палић и сар., 2003; Chou и сар., 2013). Доминатне компоненте у уљу *A. crithmifolia* су биле камфор 27,6%, 1,8-цинеол 26,5% и *транс*-хризантенил ацетат 18,8%, док је узорак уља *A. nobilis* садржао артемизиа кетон (14,8%) и камфор (8,2%).

Подаци о антимикробној активности: У раду истих аутора (Палић и сар., 2003) презентована је и антимикробна активност етарских уља биљних врста *A. crithmifolia* и *A. nobilis* које су показале јако антимикробно деловање према свим третираним микроорганизмима (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*). У студији која се бавила испитивањем антимикробне активности рода *Achillea*,

метанолни екстракти *A. crithmifolia* су у ниским концентрацијама показали активност против *S. aureus* (MIC=100 µl/mL) и *B. cereus* (MIC=200 µl/mL), али је антибактеријска активност изостала против *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* и *E. faecalis* (Karaalp i sar., 2009).

Подаци о антиоксидативној активности етарских уља и метанолних екстраката биљне врсте *A. crithmifolia* су по први пут презентовани у овој докторској дисертацији. Ови подаци су публиковани у радовима Станковић и сар. (2015) и Станковић и сар. (2016).



Slika 2-7. *Achillea crithmifolia* W.K.

2.6.8. Опште карактеристике врсте *Tanacetum parthenium* (L.) Shulz. Bip. (Fam. Asteraceae)

Tanacetum parthenium (Слика 2-8) је вишегодишња, зељаста биљка, висине 30-80 cm, са вретенастим, разгранатим, ароматичним кореном. Стабљика је усправна, донекле избраздана, у горњем делу гроњасто рашрена, гола, понекад смеђеружичаста. Листови су у општем смислу широко јајастог облика, са добро израженим дршкама. Перасто су дељени, са 3-5 сегмената који су јајсти или дугуљasti, на врху тупи. Горњи листови, понекад седећи, перасто или двоструко персто дељени са понекад сраслим сегментима. Режњеви последњег реда јајсти, често назубљени. Главице релативно

крупне, на дугачким дршкама, 1,5-2,5 cm у пречнику, у разређеним гроњастим, најчешће гранатим цвастима. Инволукрум полулоптастог облика. Листићи инволукрума су распоређени у више редова, зелени, длакави, суво кожасте, са ситно изрезаним ободом, на леђној страни са гребеном и бројним жлезданим длакама. Спољашњи листићи ланцетасти, шиљати на врху, док су унутрашњи дугуљасте и тупи. Периферни, цветови су крупни, језичасте, линеарни до широко ланцетасти, бели, 5/7 mm дуги и 2/4 mm широки. Средишњи цветови цвасти су далеко бројнији, жути, релативно ситни, правилне симетрије. Ахенија је дугачка 1-1,5 mm, прекривена ситним жлездама, чиграстог облика, са 5-6 ребара, по врху са кратким кожастим, назубљеним ободом. Цвета V-VII месеца.

Станиште: Настањује засеђена, умерено влажна места, најчешће у шумама, али се јавља и на рудералним стаништима. Често у планинским буковим и другим типовима мезофилних шума, на пожариштима и шумским прогалама, појединачно и у китњаковим шумама.

Опште распрострањење: Југоисточна Европа и Мала Азија. Интродукована у Северну и Јужну Америку (Чиле).

Примена у традиционалној медицини: Биљна врста *T. parthenium* се у традиционалној медицини користи у лечењу мигрене, затим вертига, артритиса, грознице, менструалних проблема, мучнине, зубобоље и уједа инсеката (Асенов и сар., 1998; Тасић и сар., 2004).

Подаци о фитохемијским својствима: Испитивањем хемијског састава етарског уља биљне врсте *T. parthenium* бавили су се многи истраживачи (Polatoglu и сар., 2010; Rateb и сар., 2007; Mohsenzadeh и сар., 2011; Izadi и сар., 2010; 2013). У узорцима *T. parthenium* са два различита локалитета у Турској, су доминантне компоненте у уљу узорака са једног локалитета биле камфор 49%, транс-хризантенил ацетат 22,1% и камфен 9,4%, а у уљу са другог локалитета камфор 60,8% и камфен 6,8% (Polatoglu и сар., 2010). Сличан састав је био и у узорцима са локалитета у Ирану са доминантним компонентама камфор (45%), хризантенил ацетат (21,5%) и камфен (9,6%) (локалитет Хамедан) и (локалитет Техеран) камфор 10,3% – 53,3%, хризантенил ацетат 4,3% – 22,5% и камфен 4,1% – 10,4% (Izadi и сар., 2010; 2013). У компаративној студији хемијског састава етарских уља листова и цвасти *T. parthenium* из Египта, главне компоненте су биле камфор (37,7% и 48,4%) и хризантенил ацетат (33,8% и 26,3%) у лишћу и цвастима (Rateb и сар., 2007). Најмањи проценат камфора (18,94%) је

био присутан у уљу *T. parthenium*, у тренутку цветања, са локалитета у Ирану (Mohsenzadeh и сар., 2011).

Подаци о антимикробној активности: Неколико аутора је презентovalo резултате тестирања антимикробног деловања етарског уља *T. parthenium*. Испитивање антимикробног деловања етарског уља *T. parthenium* против изабраних бактеријских сојева (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*) је вршено уз помоћ диск дифузионе и микродилуционе методе. Грам (-) бактерије су се показале мање осетљивим на деловање уља. Просечан дијаметар инхибиционе зоне за Грам (+) бактерије је био већи код уља него код ванкомицина и амфотерицина Б, док је код Грам (-) бактерија био мањи него код гентамицина (Izadi и сар., 2013). Исти аутори су испитивали антимикробну активност уља исте врсте диск дифузионом методом према изабраним патогенима (*B. subtilis*, *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *S. marcescens*, *E. coli* и *P. aeruginosa*). Резултати су показали значајну разлику између Грам (+) и Грам (-) бактерија, при чему су Грам (+) бактерије (*B. cereus* и *S. aureus*) биле много осетљивије (Izadi и сар., 2010). Уље ове врсте је тестирано и против 5 Грам (+) и 5 Грам (-) сојева микродилуционом методом. Најјача активност је детектована у односу на *B. subtilis*, *S. aureus* и метицилин резистентни *S. aureus*, и у поређењу са референтним антибиотикима уља су имала веће МИС вредности (Polatoglu и сар., 2010).

Подаци о антибактеријској активности метанолних екстраката *T. parthenium* су први пут објављени у овој докторској дисертацији. Такође, по први пут су презентовани подаци о антиоксидативној активности етарског уља *T. parthenium*, док је антиоксидативна активност метанолних екстраката ове биљне врсте представљена само у једном раду (Changqing и сар., 2006). Ови подаци су публиковани у радовима Станковић и сар. (2015) и Станковић и сар. (2016).

Slika 2-8. *Tanacetum parthenium* L. Shulz. Bip

2.7. Секундарни метаболити биљака

Употреба биљака у лечењу неких обољења је заснована на присуству одређених састојака у тим биљкама. Данас је велики број једињења изолован из биљака, структура им је хемијски детерминисана, а фармаколошко деловање потврђено. Фармаколошки активни састојци биљака су секундарни метаболити, тј. продукти секундарног метаболизма. Секундарни метаболизам представља директан наставак примарних метаболичких процеса и повезан је са катаболизмом и/или трансформацијом молекула шећера, аминокиселина или масних киселина. Известан број секундарних метаболита показује фармаколошку активност (Ковачевић, 2004). Присуство и активност одређених ензима је основни предуслов за почетак неких метаболичких процеса у биљној ћелији. Одређени гени су одговорни за синтезу протеина (ензима), а експресија гена је условљена генетским и физиолошким факторима. Када се ћелија налази у оптималном физиолошком стању за активирање гена и синтезу ензима, онда долази до почетка једног биохемијског процеса. Процеси примарног и секундарног метаболизма се могу генерисати само до одређене фазе, односно интермедијера, док на даље метаболичке процесе и синтезу различитих метаболита свака биљна врста контролише сама.

Данас се зна да секундарни метаболити имају улогу у адаптацији биљних врста на различите еколошке факторе и да су управо они утицали на опстанак врста (учешће у процесима који омогућавају ћелијско дисање и хормонску активност, итд.). Имају и заштитну улогу зато што својом активношћу спречавају инфекције биљака

бактеријама, гљивама и вирусима, штите од прекомерне дозе ултраљубичастог зрачења, прекомерне транспирације и других неповољних еколошких фактора. Такође, кроз стварање секундарних метаболита се инактивирају и депонују штетни продукти биљног метаболизма, а доказано је да имају и алелопатску улогу.

Постоји више врста секундарних метаболита који се разликују по хемијском саставу, а као најважније издвајамо алкалоиде, феноле и терпене.

Алкалоиди поседују изразиту фармаколошку активност. Структура алкалоида је послужила за синтезу неких лековитих супстанци (морфин - аналгетици; кокаин - локални анестетици; хинин - антималярици, тубокуранин - миорелаксанти, кодеин - антитусици). Међутим због своје отровности, данас се биљке користе само као сировине за екстракцију алкалоида, а ретко за прављење галенских препарата. По својој хемијској природи алкалоиди се међусобно веома разликују, али је присуство азота у њиховом молекулу заједничка карактеристика свих алкалоида.

Алкалоиди се примењују у следеће терапијске сврхе:

1. деловање на ЦНС - депресивно (морфин, скополамин) или стимулативно (стрихнин, кофеин)
2. деловање на аутономни нервни систем - симпатомиметици (ефедрин), симпатолитици (јохимбин, ергот алкалоиди); парасимпатомиметици (езерин, пилокарпин); антихолинергици (атропин, хиосциамин); блокатори ганглија (спартеин, никотин)
3. анестезирајуће деловање (кокаин, кураре-алкалоиди)
4. цитотоксично деловање (винкрестин, винбластин, колхицин)
5. деловање на изазивача маларије (хинин)
6. антиаритмијско деловање (хинидин, ајмалин)
7. антибактеријско деловање (берберин, хелидонин)
8. амебоцитно деловање (еметин)

Фенолне компоненте представљају разнолику групу секундарних метаболита биљака који имају различите структуре и функције. Фенолне компоненте се сматрају за најважнију, најбројнију и најраспрострањенију групу једињења у биљном царству. Ове супстанце се синтетишу и током нормалног развоја биљке, као и приликом неповољних ситуација као што су на пример, стрес или УВ зрачење (Naczki, Shahidi, 2004). Фенолне компоненте имају ароматични прстен за који је везана једна или више

хидроксилних група и њихова структура може да варира од једноставног фенолног молекула до комплексног вишемолекулског полимера (Balasundram и сар., 2006). Оне могу бити класификоване по својој растворљивости у води (растворљиве - фенолне киселине, фенилпропаноиди, флавоноиде и квиноне; и нерастворљиве - кондензовани танини, лигнини и хидрокси циметна киселина) (Rispaill и сар., 2005). Фенолне киселине се могу поделити на две групе једињења: једињења хидрокси циметне киселине и једињења хидрокси бензоове киселине. Флавоноиди се деле на 10 класа једињења: флавори, флаванони, флавоноли, флаванолни, катехини, антоцијани, леукоантоцијанидини, халкони, дихидрохалкони и аурони. Ова једињења су најзаступљенија у разном воћу (Naminiuk и сар., 2012). Она су препозната као једињења антиоксидативне структуре познате по својој способности да везују слободне радикале који настају у људском организму и који су одговорни за оксидативни стрес и за настанак кардиоваскуларних болести (атеросклерозе, срчане инсуфицијенције, хипертензије, итд) (Миладиновић, 2015). До данас је познато преко 8000 различитих фенолних једињења које људи користе у својој исхрани, а који се налазе у црвеном воћу, цитрусима, чоколади, црном и белом луку, чајевима, пиву, вину, итд (Биговић, 2013). Фенолне компоненте су због тога препознате и као значајни фактори за људско здравље. Осим тога, фенолне компоненте поседују и антимикробну активност. Флавоноиди су познати по својим антимикробним својствима (Kagaalr и сар., 2009), а одређени полифеноли су препознати као потенцијални нови природни конзерванси у храни, али и као могуће нове компоненте у развијању средстава за борбу против мултирезистентних сојева бактерија (Daglia, 2012). Доказано је да кондензовани танини, проантоцијанидини, антоцијани и флавоноли пореклом из воћа, могу да делују на бактеријске врсте родова *Helicobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Escherichia* и *Campylobacter* и да се на тај начин могу спречити разне инфекције уринарног тракта, желуца, итд. Ове фенолне компоненте су вршиле дестабилизацију и пермеабилizацију цитоплазматске мембране бактерија, инхибицију екстрацелуларних ензима, директно су утицали на метаболизам бактерија, као и на разградњу хранљивих материја потребних за њихов развој (Puupponen-Pimia и сар., 2005). Исти аутори наводе да степен хидроксилације може утицати на антимикробни потенцијал чистих фенолних једињења и да повећање броја хидроксилних група утиче на повећање антимикробне способности. Међутим, закључено је да фенолне киселине делују само на Грам (-) бактерије (Puupponen-Pimia и сар., 2001).

Терпеноиди или терпени представљају једну од најбројнијих група секундарних метаболита биљака. Ружичка је 1953. године разјаснио начин формирања различитих врста терпена. Он је закључио да из активираних мевалонске киселине (3,5-дихидрокси-3-метил-валеријанске киселине) настаје изо пентенилпирофосфат и његов таутомер диметилаллилпирофосфат. Он представља почетну јединицу на коју се адират пентенилпирофосфат. Њиховим повезивањем настају фосфорилувани (C5) и алкохоли и то: геранилпирофосфат као прекурсор монотерпена; фарнезилпирофосфат као прекурсор сесквитерпена; геранилгеранилпирофосфат као прекурсор дитерпена; геранилфарнезилпирофосфат као прекурсор сестертерпена (Ковачевић, 2004).

На основу основног скелета природни терпени су подељени на:

1. монотерпене - регуларни (испарљиви монотерпени су састојци етарског уља и олеорезина, а неиспарљиви монотерпени су иродоиди, агликони горких хетерозида и валеопотријати); ирегуларни (јављају се у пиретринима); 2. сесквитерпене (испарљиви сесквитерпени су састојци етарских уља, а неиспарљиви се најчешће јављају у облику сесквитерпенских лактона); 3. дитерпене (састојци су смола, а јављају се и као алкалоиди); 4. тритерпене (састојци су смола, а јављају се и као слободни, као сапогенини сапонозида и агликони хетерозида); 5. тетратерпене (каротеноиди); 6. политерпене (праве гуме, каучук).

Етарска уља представљају специфичне, најчешће течне продукте биљног ткива. То су више или мање сложене смеше различитих испарљивих моно или сесквитерпена и фенилпропанских једињења. Активност етарских уља представља мешавину активности његових активних компоненти, а једна од најзначајнијих је антимикробна активност. Ова активност често је узрокована управо присуством разних терпена у етарским уљима. Познато је да су моно- и сесквитерпени у етарским уљима разлог за њихово деловање против клиничких изолата и бактеријских изолата из хране (Burt, 2004). Карвакрол, еугенол и тимол (моноциклични, оксидовани, ароматични монотерпени) су деловали против сојева *S. aureus* и *S. aureus* (MRSA) у истим MIC концентрацијама што значи да су ови терпени способни да прођу кроз егзополисахаридни слој бактеријске ћелије и да изазову инхибиторни и бактерицидни ефекат (Gallucci и сар., 2010). Слично претходном, доказано је да три терпенска алкохола (фарнезол, неролидол и плаунотол) могу да пробију ћелијску мембрану код *S. aureus* (Inoue и сар., 2004). Висок проценат терпенских деривата (93,49%) у етарском уљу *Croton hirtus* (Euphorbiaceae) је условио смањење MIC вредности за гентамицин

против соја *S. aureus* (Touge и сар., 2014). Доказано је да терпени независно, али и у комбинацији делују антимикробно. Карвакрол и тимол су деловали бактерицидно, а комбинације гераниола и ментола против сојева *S. aureus* и *B. cereus*, као и тимола и ментола против соја *B. cereus*, су деловале потпунио синергистички (Gallucci и сар., 2009). Осим антимикробног, терпени поседују и доказано антиоксидативно дејство. Оксигеновани монотерпени, нарочито тимол и карвакрол, су показали веома изражену антиоксидативну активност. Монотерпенски угљоводоници поседују антоксидативну активност, али не већу од оксигенованих монотерпена, док сесквитерпенски угљоводоници и оксидовани деривати имају слабо изражену антиоксидативну активност (Zengin и Baysal, 2014). Фенолни дитерпени карнозол и карнозинска киселина, као и фенолни монотерпени тимол и карвакрол из екстракта рузмариносе носе одговорност за уочене антиоксидативне ефекте, а γ -терпинен који је нефенолни терпен, такође је имао јако антиоксидативно дејство (Grassmann, 2005). Монотерпени и сесквитерпени имају улогу и као алелопатски агенси, репеленти или као атрактанти у интеракцијама између биљака и биљака и животиња. Такође, имају своју запажену улогу везано за људско здравље. Већина истраживања која је спроведена на лимонену, перилил алкохолу, карвону и карвеолу указују на њихове хемотерапеутске ефекте. Један број монотерпена поседује антитуморску активност доказану на животињским моделима, а клиничка испитивања на људима су у току. Монотерпени утичу на канцерогенезу и у почетним и у каснијим фазама болести, а лимонен и перилил алкохол су једне од супстанци које могу бити важне у лечењу канцера (Grassmann, 2005).

Поједина етарска уља утичу на опуштање спазма глатке мускулатуре дигестивног тракта, стимулишу лучења у овим органима и побољшавају варење хране. Делују као благи седативи, релаксирајућа средства и средства за отклањање несанице. Доводе до проширења капилара у површинским слојевима коже, при чему се повећава се прокрвљеност, што утиче на повећање осећаја топлоте и смањење осећаја бола. Овакви, рубефацијентни ефекти се користе у смањењу болова у периферним мишићима. Нека уља имају благи анестезирајући ефекат. Могу деловати експекторантно на слузнице бронхија и утицати на појачану активност цилијарног епитела у њима. Локалном иритацијом бубрежних тубула доводе до диуретичног ефекта (Ковачевић, 2004).

Етарска уља ретко испољавају хроничану токсичност. Највећа опасност постоји од акутног тровања и ретко примене велике дозе уља. Тујон, пинокамфон и слична једињења могу да доведу до епилептичних и тетаничних напада и да изазову психичке поремећаје. Теоријски постоји могућност да ментол или камфор доведу до грчења једњака. Постоји мало података о мутагеном, тератогеном и канцерогеном деловању етарских уља или њихових састојака. Ипак, треба бити обазрив у примени етарских уља, нарочито приликом њихове употребе у ароматерапији.

2.8. Механизам деловања етарских уља и екстраката на патогене микроорганизме

С обзиром на то да се етарска уља састоје од великог броја хемијских компонената и њихово антибактеријско дејство је засновано на више различитих механизма. Различите компоненте етарских уља самостално или синергистички делују на различите структуре бактеријске ћелије и зато се антимикуробна активност етарских уља може у многоме разликовати од активности појединачних компоненти тих уља (Delaquis и сар., 2002). Због своје хидрофобне природе етарска уља интерагују са липидном мембраном бактеријске ћелије и повећавају њену пермеабилност. Пермеабилност ћелијске мембране настаје као резултат промене мембранског потенцијала, колапса протонске пумпе, изласка јона из ћелије што за последицу има лизу и ћелијску смрт. Сматра се да је овај механизам најодговорнији за оштећење бактеријске ћелије (Burt, 2004; Bakkali и сар., 2008; Lv и сар., 2011; Вајрај и сар., 2012; Бошковић и сар., 2013). За оштећење ћелијске мембране често су одговорна фенолна једињења која садрже хидроксилну групу, као што су карвакрол, тимол и еугенол, због којих етарска уља и делују антибактеријски. Осим фенола, антимикуробно дејство имају и алкохоли, нешто слабије алдехиди и кетони, док је инхибиторна активност угљоводиничних монотерпена мала (Станковић и сар., 2011). Компоненте етарских уља не делују само на липиде мембране, већ и на протеине као што је ензим аденозинтрифосфатаза. Резултати истраживања су показали да етарска уља могу деловати и на друге ензиме који су укључени у регулацију енергије или одговорне за синтезу структурних компоненти ћелије (Burt, 2004; Вајрај и сар., 2012). Етарска уља доводе и до инхибиције синтезе ДНК, РНК, протеина, полисахарида бактеријских и фунгалних ћелија (Himejima и сар., 1993). Кроз многа истраживања је потврђено да

Грам (-) бактерије поседују већу резистентност на антисептике и дезинфекциона средства од Грам (+) бактерија (Mcdonnell и сар., 1999). Разлог за овакву отпорност Грам (-) бактерија се налази у постојању још једне мембране око пептидогликанског дела ћелијског зида (Ratlidge, Wilkinson, 1988). Постојање ове мембране смањује дифузију хидрофобних компоненти кроз њихов липополисахаридни омотач (Vaara, 1992). Једна од посебно отпорних Грам (-) бактерија на деловање етарских уља је врста *Pseudomonas aeruginosa*. За њу је специфично присуство хидрофилне мембране. На њеној површини се формира селективно пропустљива мембрана кроз коју могу да пролазе мали хидрофилни молекули, док хидрофобни макромолекули (попут оних који улазе у састав етарских уља) остају са спољне стране мембране (Nikaido, 1994).

Осим што инхибирају и заустављају раст и развој бактерија, етарска уља спречавају и продукцију токсина. У ранијој студији указано је да етарска уља неких биљака смањују патогеност *L. monocytogenes* редукујући продукцију листериолизина О и фосфатидилхолин-специфичне фосфолипазе С, као и α -токсина и ентеротоксина А и Б код *S. aureus-a* (Smith-Palmer и сар., 2004). Електронска микроскопија представља метод избора за посматрање физичких ефекта етарских уља на микроорганизме (Burt, 2004).

3. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу прегледа доступне литературе извршен је одабир биљних врста из фамилија Lamiaceae (*Hyssopus officinalis*), Asteraceae (*Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Tanacetum parthenium* и *Artemisia absinthium*) и Apiaceae (*Laserpitium latifolium*, *Angelica sylvestris* и *Angelica panceicii*) чија су антимикробна, антиоксидативна и фитохемијска својства непозната или недовољно испитана. Осим тога, у објављеним радовима нигде није испитивана антимикробна активност против мултирезистентних патогених бактерија изолованих из хуманог материјала. У складу са тим, у овој докторској дисертацији су постављени следећи циљеви истраживања:

1. Извршити селекцију материјала: мултирезистентних сојева и биљних врста са антимикробним потенцијалом;
2. Утврдити квантитативна и квалитативна својства етарских уља и екстраката изабраних биљних врста;
3. Испитати антиоксидативна својства етарских уља и екстраката и извршити компаративну анализу са постојећим подацима;
4. Одредити *in vitro* антибактеријску активност етарских уља и екстраката изабраних биљних врста;
5. Испитати потенцијално синергистичко деловање фитонцида и антибиотика у односу на изоловане хумане патогене.
6. Проценити могућност примене биљних метаболита у контроли антибиотик резистентних сојева;

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

I. МАТЕРИЈАЛ

4.1. Раствори и реагенси

Трифенил тетразолиум хлорид (ТТС) - Радни раствор је прављен растварањем 0,5 g прашкасте супстанце у 100 mL дестиловане воде, након чега је раствор стерилисан и чуван на 4⁰С до употребе.

Физиолошки раствор - Физиолошки раствор је 0,9% раствор натријум-хлорида. Радни раствор је прављен растварањем 9 g NaCl у 1L дестиловане воде, након чега је раствор стерилисан и чуван на температури од 4⁰С до употребе.

10% раствор ДМСО-а (диметил сулфоксид) - Радни расвор је направљен растварањем 10g ДМСО-а у 100 mL дестиловане воде, након чега је раствор стерилисан и чуван на температури од 4⁰С до употребе.

Милер Хинтон бујон (Müller Hinton Broth, HiMedia, M391) је коришћен као течна подлога за гајење бактеријских култура у експериментима за одређивање минималних инхибиторних (МИК) и минималних бактерицидних концентрација (МБК) етарских уља и метанолних екстраката. 1L подлоге садржи: месни екстракт (300g), казеин хидролизат (17,5g), штирак (1,5g). Коначна рН вредност је 7,4±0,2 на 25⁰С. Подлога је припремана растварањем 21,0 g суве подлоге у 1L дестиловане воде. Након стајања од 15 минута и иницијалног загревања на решоу ради потпуног растварања, вршено је аутоклавирање у трајању од 20 минута на 121⁰С.

Хранљиви агар (Торлак) је коришћен за пресејавање микроорганизама при њиховом одржавању, као и за добијање преконоћних култура од којих су прављене суспензије микроорганизама. Састав ове подлоге на 1L је следећи: пептон (15 g), месни екстракт (3g), натријум хлорид (5g), калијум фосфат (0,3g), агар агар (18g). Коначна вредност рН је 7,3 на 25⁰С. Припрема ове подлоге је вршена суспендовањем 38 g суве подлоге у 1L дестиловане воде. Након стајања од 15 минута и иницијалног загревања на решоу ради потпуног растварања, вршено је разливање подлога и аутоклавирање у трајању од 20 минута на 121⁰С.

4.2. Биљни материјал

4.2.1. Сакупљање и идентификација биљног материјала

Надземни делови одабраних биљних врста из фамилија Lamiaceae (*Hyssopus officinalis*), Asteraceae (*Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Tanacetum parthenium* и *Artemisia absinthium*) и Apiaceae (*Laserpitium latifolium*, *Angelica sylvestris* и *Angelica paniculata*) су сакупљени током летњих месеци, 2012. и 2013. године на територији југоисточне Србије. Сакупљене биљне врсте су идентификоване од стране др Бојана Златковића. Идентификација биљног материјала извршена је на основу стандардне ботаничке (флористичке) литературе за територију Србије (Јосифовић, 1970-1977). Хербаризовани примерци идентификованих врста су инвентарисани и депоновани у збирци “Herbarium Moesiacum Niš” (HMN), Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу.

Биљни материјал је, непосредно након сакупљања у природи, очишћен од примеса и транспортован до места његове примарне прераде. Потом је, до момента постизања константне суве масе, сушен на собној температури, у сенци, у добро проветреном и заштићеном простору. Осушен биљни материјал је упакован у папирне вреће и складиштен у тамном, сувом простору до момента даље обраде.

Преглед биљних врста, са бројевима ваучер примерака, деловима коришћеним за анализу, подацима о фенофази, станишту и локалитетима на којима је вршено сакупљање материјала приказан је у **Табели 4-1**.

Табела 4-1. Информације о сакупљеном и испитиваном биљном материјалу

Биљне врсте	Делови биљака	Фенофаза	Станиште	Локалитет
<i>Achillea grandifolia</i> (7270)	надземни део са цвастима	Цветање	обод шуме	кањон Јерме, село Трнски Одоровци
<i>Achillea crithmifolia</i> (7272)	надземни део са цвастима	Цветање	каменити проплаци	Стара Планина, село ЦрниВрх
<i>Angelica pancicii</i> (6924)	надземни део са цвастима	Цветање	влажна места, обала потока	Власина, село Црна Трава
<i>Angelica sylvestris</i> (6923)	надземни део са цвастима	Цветање	влажне ливаде	Димитровград, село Мазгош
<i>Artemisia absinthium</i> (7278)	надземни део са цвастима	Цветање	рудерално, поред пута	Нишка Бања, село Малча
<i>Hyssopus officinalis</i> (7271)	надземни, зелени делови	Веgetативна	камењари	Височка Ржана, село Рсовци
<i>Laserpitium latifolium</i> (7273)	надземни део са цвастима	Цветање	високопланински пашњаци	Стара Планина, врх Бабин Зуб
<i>Tanacetum parthenium</i> (7277)	надземни део са цвастима	Цветање	букова шума	Стара Планина, врх Бабин Зуб

4.2.2. Изоловање етарског уља из биљног материјала

За добијање етарских уља коришћена је метода хидродестилације у апаратури по Клевенцеру (Clevenger, 19128). Одмерен, осушен и уситњен биљни материјал стављен је у балон за дестилацију и преливен дестилованом водом. Процес дестилације уља трајао је око 3 h. Вискозна уља су одвајана од водене фазе помоћу етра у левку за одвајање. Остатак воде је уклоњен помоћу анхидрованог Na_2SO_4 . Упаравање етра извршено је помоћу вакуум упаривача. Измерена је маса чистог уља и израчунат његов удео у односу на укупну количину осушеног биљног материјала.

4.2.3. Припрема метанолних екстраката

Осушен и уситњен биљни материјал (10 g) је екстрахован са 100 mL 95% метанола уз коришћење нискофреквентног ултра звука, без присуства сунчеве светлости. Обрада ултразвуком је изведена 2 пута у трајању од 30min, уз помоћ ултразвучног купатила (Sonic, Ниш, Србија, унутрашње димензије: 30x 15 x 20 cm; укупна номинална снага: 350W; фреквенција: 40KHz). Температура је одржавана на

25⁰С. На крају процеса екстракције, екстракти су упарени вакуум упаривачем до добијања сувих метанолних екстраката који су били предмет даље анализе. Екстракти су паковани у бочице и чувани у фрижидеру.

4.3. Бактеријски сојеви

Од 60 бактеријских клиничких изолата из брисева рана, грла, спутума и аспирата пацијената, тестираних антибиограм методом, на 19 стандардних антибиотика, извршен је одабир 16 мултирезистентних сојева: *Escherichia coli* (брисеви рана, грла и аспират), *Pseudomonas aeruginosa* (брис ране и два изолата из спутума), *Klebsiella* sp. (брис ране и спутум), *Proteus mirabilis* (брис ране), *Acinetobacter* sp. (брис ране), *Staphylococcus aureus* (брис ране и носа), *Streptococcus pyogenes* (брис ране и грла), *Streptococcus pneumoniae* (брис носа) и *Enterococcus faecalis* (брис ране). Извор: Институт за јавно здравље Ниш.

4.3.1. Изолација и идентификација бактеријских сојева из хуманог материјала

Изолација и идентификација испитиваних бактеријских сојева вршена је стандардним микробиолошким методама, на основу њихових микроскопских, културалних и физиолошко-биохемијских особина (Winn, Koneman, 2006). У поступку изолације и идентификације коришћене су следеће подлоге и тестови:

Staphylococcus aureus - Columbia агар (Oxoid), Chapman са новобиоцином агар (Oxoid), тест коагулације плазме (HiMedia);

Streptococcus pyogenes - Columbia агар (Oxoid), Бацитрацински тест, Аглутинација Стрептокитом А (Oxoid);

Streptococcus pneumoniae - Columbia агар (Oxoid), Оптихински тест, Аглутинација Пнеумокитом (Oxoid);

Enterococcus faecalis - Columbia агар (Oxoid), Roche-ova подлога (билл-ескулин агар) (Merck);

Escherichia coli - Ендо агар (HiMedia), стандардна биохемијска серија (Клиглеров двоструки шећер, пептонска вода-индол реакција са Ковачевим реагенсом, Кристенсенова уреа, Симонсов цитрат, париски манит) (Oxoid);

Pseudomonas aeruginosa - Columbia агар (Oxoid), стандардна биохемијска серија (Клиглеров двоструки шећер, пептонска вода-индол реакција са Ковачевим реагенсом, Кристенсенова уреа, Симонсов цитрат, париски манит) (Oxoid), King A и King B агар (Hi media), Милер Хинтон агар на 42⁰С;

Acinetobacter sp. - Columbia агар (Oxoid), стандардна биохемијска серија (Клиглеров троструки шећер, пептонска вода-индол реакција са Ковачевим реагенсом, Кристенсенова уреа, Симонсов цитрат, париски манит) (Oxoid), препарат по Граму;

Proteus mirabilis - Columbia агар (Oxoid), стандардна биохемијска серија (Клиглеров троструки шећер, пептонска вода-индол реакција са Ковачевим реагенсом, Кристенсенова уреа, Симонсов цитрат, париски манит) (Oxoid);

Klebsiella sp. - Ендо агар (HiMedia), стандардна биохемијска серија (Клиглеров троструки шећер, пептонска вода-индол реакција са Ковачевим реагенсом, Кристенсенова уреа, Симонсов цитрат, париски манит) (Oxoid), Орнитин декарбоксилаза (ODC) тест (Oxoid).

4.3.2. Стандардна антибиограм метода

Осетљивост тестираних бактеријских сојева је испитивана Кирби-Бауер диск-дифузионом методом, на плочама са Милер Хинтон агаром, према CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) протоколу (CLSI, 2009). По CLSI протоколу коришћени су следећи антибиотици: еритромицин (ER) 15 µg, клиндамицин (CM) 2 µg, доксицилин (DOX) 30 µg, пеницилин (PEN) 10 IU, цефокситин (CFO) 30 µg, цефтриаксон (CTR) 30 µg, цефуроксим (CXM) 30 µg, амоксицилин (АМОК) 10 µg, амоксицилин-клавулинска киселина (АМС) 20/10 µg, триметоприм-суфаметоксазол (TS) 1,25/23,75 µg, ампицилин сулбактам (SAM) 10/10 µg и оксацилин (OX) 1 µg, гентамицин (GM), амикацин (AK), ципрофлоксацин (CIP), имипенем (IMI) 10 µg, меропенем (MER) 10 µg, пиперацилин тазобактам (TZP), фуцидинска киселина (FK). Као контролни сојеви су коришћени следећи референтни сојеви: *E. coli* ATCC 2922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 и *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Приликом тестирања сојева *E. coli* (брисеви рана, грла и аспират), *Klebsiella* sp. (брис ране и спутум) и *P. mirabilis* (брис ране), коришћени су следећи антибиотици: пиперацилин тазобактам, амоксиклав, цефтриаксон, цефуроксим, имипенем,

меропенем, гентамицин, амикацин, цiproфлoкаcацин; за *P. aeruginosa* (брис ране и два изолата из спутума) - пиперацилин тазобактам, цефтазидим, имипенем, меропенем, гентамицин, амикацин, цiproфлoкаcацин; за *Acinetobacter* sp. (брис ране) - ампилицин-сублактам, цефтриаксон, цефтазидим, пиперацилин тазобактам, имипенем, меропенем, гентамицин, амикацин, цiproфлoкаcацин, триметоприм-суфаметоксазол, доксициклин; за *S. aureus* (брис ране) - пеницилин, цефокситин, еритромицин, клиндамицин, гентамицин, цiproфлoкаcацин, доксициклин, фуцидинска киселина; за *S. pyogenes* (брис ране) - цефтриаксон, еритромицин, клиндамицин; за *S. pneumoniae* (брис носа) - пеницилин, цефтриаксон, еритромицин, клиндамицин; за *E. faecalis* (брис ране) - еритромицин, доксициклин, гентамицин, цiproфлoкаcацин.

II. МЕТОДЕ

4.4. Хемијска анализа етарских уља

4.4.1. Гасна хроматографија (ГХ) и гасна хроматографија/масена спектрометрија (ГХ/МС)

Хемијски састав уља је анализиран помоћу ГХ и ГХ/МС метода. ГХ/МС анализа (3 ињектовања) је изведена коришћењем агилент QQQ гасног хроматографа, који је опремљен капиларном колоном HP-5 (5% фенилметилсилоксана, 30 m x 0,25 mm, дебљина филма 0,25 μ m, Agilent Technologies, USA), који је био директно куплован са 5975 Б, масеним детектором исте компаније. Јонизација је вршена електронима енергије 70 eV. Пун скен масеног детектора бележен је у интервалу m/z 35-500 (брзина скенирања 5 скенова / s), а време скенирања је било 0,32 s. Режим рада ГХ/МС био је: температуре ињектора и детектора одржаване су на 250°C и 300°C; температура пећи је програмирана линеарно од 70 до 290°C, брзином од 5°C/min, након тога је температура одржавана 10 минута на 290°C; као носећи гас коришћен је хелијум, чији је константни проток одржаван на 1,0 mL/min; пулсно је ињектирана запремина од 1 μ L раствора етарског уља у диетил-етру (проток је био 1,5 mL/min у првих 30 s, а онда је подешен на 1 mL / min), разблажења 1/100; сплитована у односу 40:1.

ГХ (ФИД) анализа рађена је под истим експерименталним условима, коришћењем колоне исте поларности која је била описана за ГХ/МС. Процентни састав уља је добијен интегралњем хроматограма без коришћења корекционих фактора.

4.4.2. Идентификација компоненти

Компоненте уља су идентификоване на основу поређења њихових линеарних ретенционих индекса, рачунатих на основу ретенционих времена хомологе серије *n*-алкана C7–C34 на HP-5 колони (Van den Dool и Kratz, 1963), са литературним вредностима (Adams, 2007). Идентификација је такође остварена поређењем њихових масених скенова, након деконволуције програмом AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, Ver. 2.1, DTRA / NIST; 2002), са масеним спектром стандарда и / или масеним спектрима из Wiley 6, NIST02, MassFinder 2.3 библиотека и из МС библиотеке направљене на основу чистих супстанци и познатих компонената етарских уља. Када је год то било могуће, идентификација је потврђивана коинјектирањем са стандардом.

4.5. Методе за утврђивање антиоксидативне активности етарских уља и метанолних екстраката

4.5.1. Методе за утврђивање антиоксидативне активности етарских уља

4.5.1.1. DPPH (2,2-дифенил, 1-пикрил хидразил) тест

Одређивање антиоксидативне способности DPPH тестом рађено је спектрофотометријски, методом по Блоису (Blois, 1958). По 300 μL метанолног раствора испитиваних етарских уља (концентрације уља 30–150 $\mu\text{L/mL}$) додато је у 2,70 mL метанолног раствора DPPH (концентрације од 0,04 mg/mL). Након мућкања, реакциона смеша је инкубирана на собној температури у трајању од 30 минута. Абсорбанција преосталих DPPH радикала је мерена на 517 nm након истека 30 min (A1) на Shimadzu, UV-Visible PC 1650 спектрофотометру. Апсорбанције сваког узорка, витамина C и ВНА стандарда ("Butylated Hydroxy Anisole") су мерене у три

понављања. Слепа проба је направљена на исти начин, са метанолом, као и испитивани раствори (A_0). Смањење апсорбације DPPH раствора је израчунавано по формули:

$$\text{Проценат смањења апсорбације (на 517 nm)} = (A_0 - A_1) \times 100 / A_0$$

A_0 - средња вредност апсорбације следеће пробе;

A_1 - средња вредност апсорбације узорка

Концентрације које смањују апсорпцију DPPH раствора за 50% (EC_{50}) су добијене са калибрационе криве где је представљена зависност апсорбације DPPH rastvora на 517 nm и концентрације за сваки узорак (укључујући и контролни).

4.5.1.2. ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) тест

Овај тест је базиран на Милер и Рајс-Евансовој методи (Miller, Rice-Evans, 1997), са малим модификацијама. За добијање радне смеше коришћено је 19,2 mg ABTS-а и 5 mL раствора $K_2O_8S_2$ (2,46 mM). Смеша се остави да стоји 12-16 сати у мраку на собној температури. 1 mL раствора ABTS се раствори са 100-110 mL воде да би се добила апсорбација од $0,7 \pm 0,02$ на 734 nm уз употребу спектрофотометра (Shimadzu, UV-Visible PC 1650). Нови раствор ABTS је припреман за сваку анализу. Запремина од 75 μ L испитиваног раствора или стандардног раствора је помешана са 3 mL припремљеног ABTS реагенса и остављена да се инкубира на 30°C у трајању од 30 min. Након тога је вршено мерење апсорбације на 734 nm. Модификација методе је следећа: уместо етанола (95%) као слепа проба је коришћена вода, а уместо Troloksa коришћен је витамин C за добијање калибрационе криве (Matejić, 2013). ABTS тест је рађен са екстрактима и израчунаван на основу калибрационе криве за витамин C (0-2 mg/L) и изражаван као Витамин C по граму сувог екстракта. Сва мерења су урађена у три понављања и изражена су као средња вредност три анализе $\pm$ стандардна девијација.

4.5.2. Методе за утврђивање антиоксидативне активности метанолних екстракта

4.5.2.1. Одређивање укупних фенола

Концентрација укупних фенола одређивана је спектрофотометријски према методи по Фолин-Сјоклтоу, са малим модификацијама (Митић и сар., 2011). Растворени метанолни екстракт (0,1 mL) и 1 mL Фолин-Сјоклто (Folin–Ciocalteu) реагенса су помешани у мензури од 20 mL. Након 1 min, додата су 4 mL натријум карбоната (20%, v/w), а затим је додавањем дестиловане воде направљена смеша укупне запремине од 20 mL. Смеша је држана на собној температури, у мраку, у трајању од 30 min, а апсорбанција раствора је мерена на 750 nm UV-VIS спектрофотометром (Lambda 15, Perkin-Elmer, USA). По потреби, узорак је разблаживан да би се добиле вредности апсорбације мање од 1. Укупни феноли су квантификовани помоћу калибрационих кривих добијених мерењем апсорбације стандардних растворима галне киселине (15-350 $\mu\text{g/mL}$ у 95 % метанолу). Сва мерења су извршена у три понављања. Подаци су изражени као еквиваленти галне киселине у милиграмима по граму сувог екстракта.

4.5.2.2. Одређивање укупних флавоноида

Укупни флавоноиди су одређивани коришћењем алуминијум хлорид (AlCl_3) спектрофотометријске методе (Стојановић и сар., 2010). У 0,5 mL сваког екстракта је додавана смеша растварача ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}=14:5:1$) до укупне запремине од 1 mL. Припремљени раствор је помешан са AlCl_3 реагенсом (4 mL, 133 mg of $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ и 400 mg CH_3COONa растворених у 100 mL H_2O). После 5 минута мерена је апсорбанција у односу на припремљену слепу пробу (садржи исте хемикалије, али без узорка) на 430 nm Perkin-Elmer Lambda 15 UV-VIS спектрофотометром). Садржај укупних флавоноида је израчунат на основу калибрационе криве за рутин и изражен као еквивалент рутина у милиграмима по граму сувог екстракта. Тестирање је изведено у три понављања и за сваки екстракт (Стојановић и сар., 2010).

4.5.2.3. DPPH (2,2-дифенил, 1-пикрил хидразил) тест

DPPH тест је спроведен у складу са методологијом коју су дали Митић и сар., (2011). По 10 μL сваког екстракта је помешано са 90 $\mu\text{mol/L}$ DPPH у метанолу до укупне запремине од 4 mL. Смеша је енергично мешана, а затим инкубирана у мраку у трајању од 60 min на собној температури. Абсорбанција добијеног раствора је мерена на 517 nm помоћу UV-VIS спектрофотометра (Lambda 15, Perkin-Elmer, USA). Све реакције су урађене у три понављања, а ВНА је био позитивна контрола. Резултати DPPH теста су изражавани помоћу следеће једначине:

$$\text{DPPH RSC (\%)} = 100 (A_0 - A_1 / A_0)$$

где је A_0 абсорбанција контролне реакције (потпуна реакција, без узорка или ВНА), а A_1 абсорбанција у присуству узорка. DPPH раствор је чуван на 4°C до употребе. Нижа абсорбанција реакционе смеше указује на јачу DPPH активност екстракта.

4.5.2.4. ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) тест

Антиоксидантни капацитет екстракта је мерен и ABTS методом. За добијање радног раствора помешано је 7 mM раствора ABTS са 2,45 mM раствора калијум персулфат, инкубирано 12 до 16 сати у мраку, да би се генерисали ABTS катјони. ABTS раствор се разблажи са етанолом да би се добиле абсорбанције од $0,700 \pm 0,050$ на 734 nm. Сви узорци су адекватно разблажени да би се добиле абсорбанције од 20-80% од вредности коју обезбеђује слепа проба. Затим је 50 μL разблаженог узорка помешано са 1,9 mL разблаженог ABTS раствора. Смеша је остављена да одстоји 6 min на собној температури и одмах је бележена абсорбанција на 734 nm. Тролокс (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина) раствор (радне концентрације 0-15 μM) је коришћен као референтни стандард. Резултати су приказани као еквивалент Тролокса у mmol/gсувог екстракта (Li и сар., 2007).

4.5.2.5. TRP (total reducing power) метода - одређивање укупне редукционе моћи

По 10 μL сваког екстракта је помешано са 1 mL 1%-тног $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и 1 mL пуфера $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (0,2 mol/L, pH 6,6). Ова смеша је инкубирана на температури од 50°C у трајању од 30 min, након чега је додат 1 mL 10%-тне трихлорсирћетне киселине, а затим је смеша центрифугирана на 3000 обртаја у трајању од 10 min. На крају је 1 mL добијеног супарнатанта помешан са дестилованом водом (1 mL) и FeCl_3 (0,2 mL, 0,1 %). Абсорбанција добијеног раствора је мерена на 700 nm. Урађена су три понављања за сваки узорак. Резултати ТРП теста су израчунати по следећој формули:

$$\text{AEAC} = C_A (A_S / A_A)$$

где је C_A - финална концентрација аскорбинске киселине у $\mu\text{g/mL}$, A_S -абсорбанција узорка, A_A -абсорбанција аскорбинске киселине (Митић и сар., 2011). Редукциона моћ је изражена у односу на редукциону моћ аскорбинске киселине као позитивне контроле (Ascorbate Equivalent Antioxidant Capacity - AEAC у mg AAE/g сувог екстракта). Растућа абсорбанција реакционе смеше указује на јачу редукциону моћ.

4.5.2.6. FRAP (Ferric reducing antioxidant power) тест - Редукциона антиоксидативна моћ према Fe

FRAP анализа је изведена према методи Wong и сар. (2006). Одговарајућа количина екстракта је додата у 1 mL FRAP реагенса (300 mM ацетатног пуфера (pH 3,6), 10 mM раствора 2,4,6-три(2-пиридил)-с-триазина (TPTZ) и 20 mM FeCl_3 (10:1:1)), а затим је додата вода да би се добила смеша укупне запремине од 4 mL. Реакциона смеша је инкубирана у воденом купатилу на 37°C у трајању од 30 min. Повећање абсорбанције је мерено спектрофотометром на 595 nm. Резултати су изражени у $\mu\text{M Fe}/10\text{g suvog ekstrakta}$.

4.6. Методе за испитивање антимикробне активности

4.6.1. Микродилуциона метода за испитивање етарских уља

Одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне бактерицидне концентрације (MBC) изведено је у *in vitro* условима према методи описаној у CLSI протоколу (2009), са одређеним модификацијама. Преконоћне културе тестираних сојева, које су узгајане на хранљивом агару, коришћене су за добијање суспензије турбидитета 0,5 McFarland-a, у стерилном физиолошком раствору (0,9% NaCl). Серије дуплих разблажења етарских уља (у 10%-тном ДМСО-у) су направљене у концентрацијама од 0,1 до 100 $\mu\text{L/mL}$ у микротитар плочама са 96 бунарића са инокулисаним хранљивим бујоном (финалне запремине 100 μL и финалне концентрације 10^6 CFU/mL, у сваком бунарићу). Плоче су инкубиране 24h на 37°C. Доксициклин, ципрофлоксацин, гентамицин и еритромицин (Sigma Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA) су коришћени као позитивна контрола са разблажењима чије су се концентрације кретале од 0,001 до 10,00 mg/mL. Испитивања су вршена у трипликату. Бактеријски пораст је одређиван додавањем 20 μL 0,5%-ног воденог раствора трифенил тетразолиум хлорида (ТТЦ) у сваки бунарић микротитар плоче. Минимална инхибиторна концентрација (MIC) је дефинисана као најмања концентрација уља при којој микроорганизми (бактерије) показују видљив раст. Да би се одредила минимална бактерицидна концентрација (MBC) садржај сваког бунарића је преношен на површину хранљивог агара који је инкубиран 24h на 37°C. Минимална бактерицидна концентрација се дефинише као најнижа концентрација уља која убија 99,9% инокулисаних микроорганизама.

4.6.2. Микродилуциона метода шаховске табле („Checkerboard“ метода)

"Checkerboard" методом се утврђује могући синергизам комбиновањем два етарска уља или антибиотика. У овом раду су, на основу резултата добијених уз помоћ микродилуционе методе, одабрана најактивнија етарска уља биљних врста *A. sylvestris* и *A. paniculata* и антибиотик са најслабијим деловањем, еритромицин. Њихово синергистичко деловање је испитивано у циљу побољшања деловања антибиотика у мањим терапијским дозама против свих изабраних бактеријских сојева.

Серије двоструких разређења сваке компоненте, почев од 4 x MIC, су припремљене према препорукама CLSI непосредно пре тестирања (Bajaksouzian и сар., 1997). За сваки тестирани сој је направљена иста суспензија турбидитета од 0,5 McFarlanda (сојеви су одабрани на основу њихове претходно тестиране осетљивости на деловање етарских уља). По 50 μ L инокулисаног Милер Хинтон бујона је дистрибуирано у сваки бунарић у микротитар плочи (96 бунарића), а затим је додато по 25 μ L од сваког разређења обеју компоненти. Серијска разређења прве компоненте (у овом случају, етарско уље *A. sylvestris* или *A. panicii*) су додата дуж ординате, док су серијска разређења друге компоненте (антибиотик еритромицин) додата дуж абсцисе. Плоче су инкубиране на температури од 37°C у трајању од 24h. Добијена шаховска табла садржи сваку комбинацију двеју компоненти, при чему се бунарићи који садрже највише концентрације сваке компоненте налазе на супротним угловима. Све анализе су урађене у трипликату. Одређивање интеракција етарског уља и антибиотика су засноване на принципу средње вредности и једначина у вези ефекта примене више лекова (Chou, Talalay, 1984). Три ефекта се издвајају: синергистички, адитивни и антагонистички. За њихово квантитивно одређивање користи се концепт фракционе инхибиторне концентрације (FIC). У циљу процењивања међусобне активности две компоненте, FIC индекс се израчунава на следећи начин:

$$FIC = \frac{MICa \text{ у комбинацији}}{MICa \text{ појединачно}} + \frac{MICb \text{ у комбинацији}}{MICb \text{ појединачно}} + \frac{MICa \text{ у комбинацији} \times MICb \text{ у комбинацији}}{MICa \text{ појединачно} \times MICb \text{ појединачно}}$$
$$FIC = FICa + FICb + FICa \times FICb$$

при чему су MICa и MICb минималне инхибиторне концентрације етарских уља и коришћеног антибиотика еритормицина. FIC индекс је израчунат уз помоћ "CalcuSyn" (Biosoft), а резултати су интерпретирани на следећи начин: синергистички ефекат (<0,90), адитиван ефекат (0,90≤FIC≤1,10) и антагонистички ефекат (>1,10) (Wyles и сар., 2007).

4.6.3. Микродилуциона метода за испитивање метанолних екстраката

Одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне бактерицидне концентрације (MBC) изведено је у *in vitro* условима према методи описаној у CLSI протоколу (2009), са одређеним модификацијама. Преконоћне културе

тестираних сојева, које су узгајане на хранљивом агару, коришћене су за добијање суспензије турбидитета 0,5 MCFarland-a, у стерилном физиолошком раствору (0,9% NaCl). Серије дуплих разблажења узорак метанолних екстраката (у 30% метанолу) су направљене у концентрацијама од 0,1 до 100 mg/mL у микротитар плочама са 96 бунарића са инокулисаним хранљивим бујоном (финалне запремине 100 μ L и финалне концентрације 10^6 CFU/mL, у сваком бунарићу). Плоче су инкубиране 24h на 37°C. Доксициклин, ципрофлоксацин, гентамицин и еритромицин (Sigma Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA) су коришћени као позитивна контрола са разблажењима чије су се концентрације кретале од 0,001 до 10,00 mg/mL. Испитивања су вршена у трипликату. Бактеријски пораст је одређиван додавањем 20 μ L 0,5%-ног воденог раствора трифенил тетразолиум хлорида (ТТЦ) у сваки бунарић микротитар плоче. Минимална инхибиторна концентрација (MIC) је дефинисана као најмања концентрација екстраката при којој микроорганизми (бактерије) показују видљив раст. Да би се одредила минимална бактерицидна концентрација (МБС) садржај сваког бунарића је преношен на површину хранљивог агара који је инкубиран 24h на 37°C. Минимална бактерицидна концентрација се дефинише као најнижа концентрација екстраката која убија 99,9% инокулираних микроорганизама.

4.7. Статистичка обрада података

Подаци су презентовани као средња вредност $\pm$ стандардна девијација три независна понављања. Резултати су упоређени једнофакторском анализом варијанси (ANOVA). Тукеј (Tukey) тест је коришћен за тестирање значајне разлике између средњих вредности (STATISTICA 7.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Разлике међу средњим вредностима на 5% нивоу ($P < 0,05$) су сматране значајним. Елиминација “спољних” резултата је изведена Грубовим (Grubbs') тестом.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У овом раду је вршено испитивање хемијског састава, антиоксидативне и антимикробне активности етарских уља и метанолних екстраката осам биљних врста које припадају фамилијама Lamiaceae (*Hyssopus officinalis*), Apiaceae (*Angelica sylvestris*, *Angelica pancicii*, *Laserpitium latifolium*) и Asteraceae (*Artemisia absinthium*, *Achillea crithmifolia*, *Achillea grandifolia*, *Tanacetum parthenium*).

Биљни материјал који је коришћен у овом истраживању је прикупљан током 2012. и 2013. године на територији југоисточне Србије, у фенофази цветања када се очекује највећи садржај биоактивних једињења. Све информације о биљном материјалу: називи испитиваних биљних врста, бројеви ваучера (приказани у заградама испод назива), анализирани биљни делови, фенофаза, станишта и локације са којих је материјал прикупљан, сумиране су и приказане у **табели 4-1**.

Из осушених и самлевених надземних делова испитиваних биљних врста, поступком хидродестилације у апаратури по Клевинцеру, изоловано је етарско уље, а поступком екстракције добијени су метанолни екстракти. Добијени приноси етарских уља и метанолних екстраката за сваку испитивану биљну врсту су дати у **табели 5-1**.

Табела 5-1. Принос етарских уља и метанолних екстраката испитиваних биљаних врста

Биљна врста	Принос етарског уља (% , v/w)	Принос метанолних екстраката (% , w/w)	Специфична тежина уља (d) (mg/mL)
<i>Hyssopus officinalis</i>	0,17	5,10	886,0
<i>Angelica sylvestris</i>	0,05	6,20	544,0
<i>Angelica pancicii</i>	0,14	8,81	964,0
<i>Laserpitium latifolium</i>	0,16	7,40	842,0
<i>Artemisia absinthium</i>	0,12	10,14	756,0
<i>Achillea crithmifolia</i>	0,22	4,74	858,0
<i>Achillea grandifolia</i>	0,30	7,32	923,0
<i>Tanacetum parthenium</i>	0,57	7,09	932,0

Садржај етарских уља испитиваних врста се је кретао у опсегу од 0,05% код биљне врсте *A. sylvestris*, до 0,57% код биљне врсте *T. parthenium*. Принос метанолних екстраката је био у опсегу од 4,74% код биљне врсте *T. parthenium* до 10,14% код биљне врсте *A. absinthium*.

5.1. IN VITRO КОНТРОЛА ПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА ПОРЕКЛОМ ИЗ ХУМАНОГ МАТЕРИЈАЛА ДЕЛОВАЊЕМ ЕТАРСКИХ УЉА

Садржај и састав етарског уља у ароматичним биљкама је генетски детерминисан, али на њега велики утицај имају и многи ендегени (фенофаза онтогенетског развоја) и егзогени фактори (надморска висина, састав земљишта и клима). С обзиром да су етарска уља већине ароматичних биљних врста комплексне смеше и да је хемијски састав у високој корелацији са њиховом антиоксидативном и антимикуробном активношћу, најпре су извршене квалитативне и квантитативне анализе изолованих етарских уља.

5.1.1. Компаративна анализа хемијског састава етарских уља одабраних биљних врста

Квалитативни и квантитативни хемијски састав изолованих уља је анализиран помоћу метода гасне хроматографије (ГХ) и комбинацијом гасне хроматографије и масене спектрометрије (ГХ/МС). Добијени хроматограми су приказани у поглављу **ПРИЛОЗИ**. Укупни феноли метанолних екстраката су одређивани по Фолин-Сјоклто методи, а укупни флавоноиди коришћењем алуминијум хлорид ($AlCl_3$) спектрофотометријске методе.

5.1.1.1. Хемијски састав етарског уља врсте *Achillea grandifolia*

Биљни материјал *A. grandifolia* Friv. је прикупљен у Кањону реке Јерме (село Трнски Одоровци) у периоду пуног цветања, у току лета 2012. и 2013. године. Након сушења надземних делова, поступком хидродестилације у апарату по Клевинџеру изоловано је 0,30% (v/w) уља. Комбинацијом ГХ и ГХ/МС анализе у етарском уљу

врсте *A. grandifolia* Friv. идентификовано је 26 једињења тј. 98,0% етарског уља. Квалитативни и квантитативни састав овог етарског уља је приказан у **табели 5-2**.

Табела 5-2. Хемијски састав етарског уља врсте *Achillea grandifolia*

Ред. бр.	Једињење	Садржај у %	Р _и	Р _Л
1	хексанал	0,1	800	801
2	хексенал<2E->	0,1	850	846
3	трициклен	0,2	923	921
4	α-пинен	0,7	935	932
5	камфен	3,1	950	946
6	бензалдехид	0,1	961	952
7	β-пинен	0,1	979	974
8	н-октанал	0,2	1004	998
9	орто-цимен	3,1	1027	1022
10	лимонен	0,2	1031	1024
11	1,8-цинеол	16,4	1034	1026
12	бензенацет алдехид	0,1	1045	1036
13	γ-терпинен	Тр	1060	1054
14	α-тујон	15,1	1108	1101
15	β-тујон	2,2	1119	1112
16	α-камфоленал	0,2	1129	1122
17	транс-пинокарвеол	0,3	1144	1135
18	камфор	45,4	1151	1141
19	сабина кетон	0,2	1160	1154
20	пинокарвон	0,2	1166	1160
21	борнеол	8,1	1168	1165
22	терпинен-4-ол	0,2	1180	1174
23	α-терпинеол	0,1	1193	1186
24	миртенал	0,1	1200	1195
25	аскаридол	0,9	1243	1252
26	борнил ацетат	0,9	1289	1287
Укупно		98,0		
Терпеноиди		97,4		
Монотерпенски угљоводоници		3,1		
Оксигеновани монотерпени		90		
Сесквитерпенски угљоводоници		-		
Оксигеновани сесквитерпени		-		
Остало		0,6		

*Једињења су наведена по редоследу елуирања на ХП-5МС колони (Р_Л: литературни ретенциони индекс, Р_и: експериментално одређен ретенциони индекс)

Хемијски састав етарског уља *A. grandifolia* карактерише значајно присуство монотерпена камфора (45,4%), и још две компоненте, 1,8-цинеола (16,4%) и α-тујона (15,1%). У мањем проценту су заступљени борнеол (8,1%), камфен (3,1%), орто-цимен (3,1%) и β-тујон (2,2%). Сва остала једињења су присутна у концентрацији мањој од 1% (**график 5-1**).

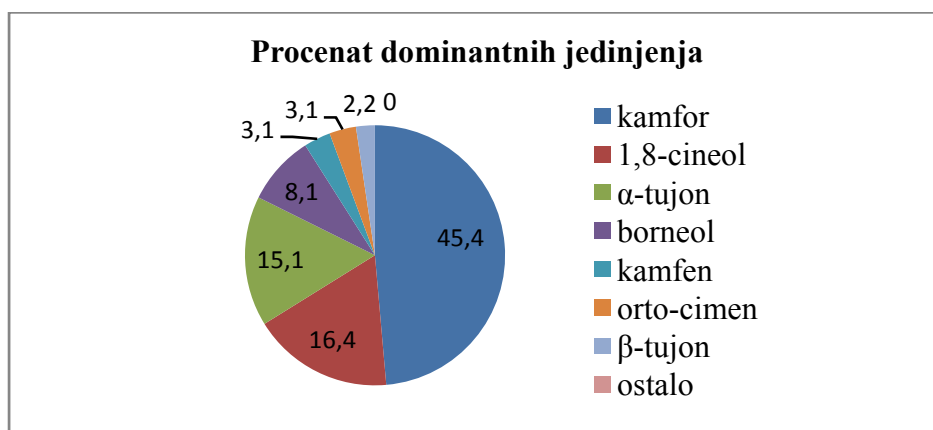


График 5-1. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте *A. grandifolia*

Принос уља нашег узорка биљне врсте *A. grandifolia* је био 0,30% што је знатно више од врсте са локалитета у Казахстану (0,18% v/w) (Suleimenov и сар., 2001). Досадашња истраживања су показала да етарска уља врста рода *Achillea* најчешће садрже доста камфора, 1,8-цинеола, артемизија кетона и α-тујона. Камфор и 1,8-цинеол су били присутни као доминатне компоненте, како у нашем узорку уља *A. grandifolia* (45,4 и 16,4 %), тако и у узорцима уља *A. sieheana* (43,36 и 6,29 %) (Albayrak, 2013), *A. crithmifolia* (27,6 и 26,5 %), *A. nobilis* (1,8-цинеоле 8,2 %) (Палић и сар., 2003) и *A. grandifolia* (камфор 15,6%) (Радуловић и сар., 2010). Компонента α-тујон, која је у нашем узорку уља *A. grandifolia* (15,1 %) имала значајнији удео, била је присутна и у узорку уља исте врсте (7,5 %) (Радуловић и сар., 2010) и у уљу врсте *A. nobilis* (25,7%) (Палић и сар., 2003) са локалитета у Србији. Треба истаћи да је потпуно различит хемијски састав уља *A. grandifolia* идентификован у узорцима са локалитета из Казахстана (β-пинене 8,9%, селин-11-ен-4α-ол 8,5% и γ-еудесмол 6,3%) (Suleimenov и сар., 2001).

5.1.1.2. Хемијски састав етарског уља врсте *Achillea crithmifolia*

Биљни материјал *A. crithmifolia* L. је прикупљен на Старој планини (место Црни Врх), у периоду пуног цветања, у току лета 2012. и 2013. године. Након сушења надземних делова, поступком хидродестилације у апарату по Клевинцеру изоловано је 0,22% (v/w) уља, интензивно жуте боје и карактеристичног јаког мириса. Комбинацијом ГХ и ГХ/МС анализе у етарском уљу врсте *A. crithmifolia* L. идентификовано је 35 једињења тј. 97,80% етарског уља. Квалитативни и квантитативни састав овог етарског уља је представљен у **табели 5-3**.

Табела 5-3. Хемијски састав етарског уља врсте *Achillea crithmifolia*

Ред. бр.	Једињење	Садржај у %	Рп	РЛ
1	хексанал	Тр	800	801
2	сантолина триен	0,2	908	906
3	трициклен	0,1	923	921
4	α -пинен	1,6	935	932
5	камфен	3,3	950	946
6	сабинен	0,1	976	969
7	β -пинен	0,7	979	974
8	мезитилен	0,2	996	994
9	јомоги алкохол	1,2	1001	999
10	α -феландрен	0,1	1007	1002
11	δ -3-карен	0,1	1013	1013
12	α -терпинен	0,2	1019	1014
13	орто-цимен	3,4	1027	1022
14	β -феландрен	1,0	1032	1025
15	1,8-цинеол	14,8	1034	1026
16	сантолина алкохол	0,4	1037	1034
17	артемизија кетон	31,7	1062	1056
18	артемизија алкохол	0,3	1084	1080
19	линалол	0,1	1100	1095
20	филифолон	0,4	1105	1109
21	α -тујон	2,2	1108	1101
22	β -тујон	0,2	1119	1112
23	хризантенон	1,8	1128	1124
24	транс-пинокарвеол	0,3	1144	1135
25	камфор	25,4	1151	1141
26	цис-хризантенон	0,1	1164	1160
27	пинокарвон	0,1	1166	1160
28	борнеол	4,6	1169	1165
29	терпинен-4-ол	0,5	1180	1174
30	α -терпинеол	0,1	1193	1186
31	миртена	0,2	1200	1195
32	фрагранол	0,9	1216	1214
33	аскаридол	0,7	1242	1234
34	цис-хризантенил ацетат	0,4	1264	1261
35	борнил ацетат	0,5	1289	1287
Укупно		97,8		
Терпеноиди		97,6		
Монотерпенски				
угљоводоници		12		
Оксигеновани				
монотерпени		85,6		
Сесквитерпенски				
угљоводоници		-		
Оксигеновани				
сесквитерпени		-		
Остало		0,2		

* Једињења су наведена по редоследу елуирања на ХП-5МС колони (РЛ: литературни ретенциони индекс, Рп: експериментално одређен ретенциони индекс)

Најзаступљенија једињења су монотерпени артемизија кетон (31,7%), камфор (25,4%) и 1,8 – цинеол (14,8%). У мањем проценту су присутна и једињења борнеол (4,6%), орто-цимен (3,4%), камфен (3,3%), α -тујон (2,2%), хризантенон (1,8%), α -пинен (1,6%), јомоги алкохол (1,2%) и β -феландрен (1,0%). Сва остала једињења су присутна у количини мањој од 1% (график 5-2).

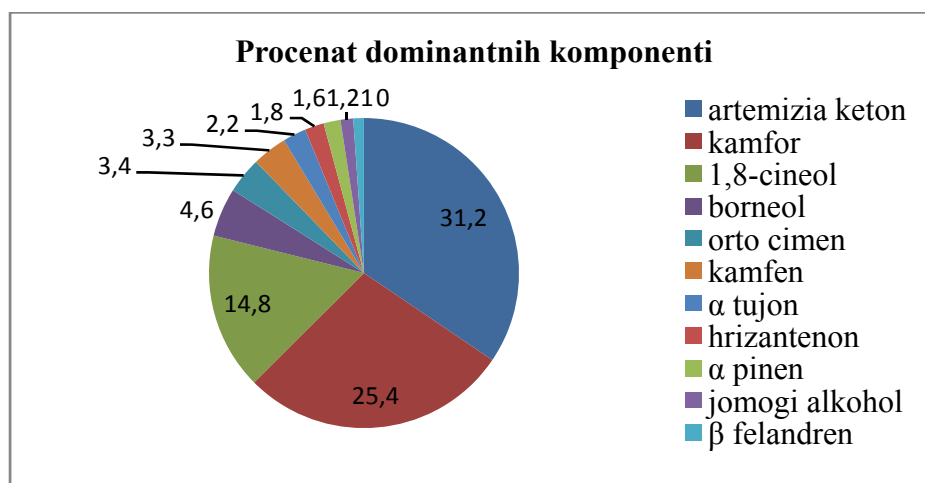


График 5-2. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте *A. crithmifolia*

Упоређујући добијени садржај доминантних компоненти етарског уља *A. crithmifolia* (артемизија кетон 31,7%, камфор 25,4% и 1,8-цинеол 14,8%), са резултатима истраживања Палић и сар., (2003) (камфор 27,6%, 1,8-цинеол 26,5% и *транс*-хризантенил ацетат 18,8%), може се уочити да оба узорка уља у високом проценту садрже камфор и 1,8-цинеол, док у узорку уља поменутих истраживача није идентификован артемизија кетон, већ је са великим уделом био присутан *транс*-хризантенил ацетат. С друге стране, узорак уља врсте *A. nobilis* садржи артемизија кетон (14,8%) и камфор (8,2%) у запаженим концентрацијама као и наш узорак уља *A. crithmifolia*, мада је доминантна компонента α-тујон (25,7%) (Палић и сар., 2003). Скорашња испитивања су показала још већу подударност у доминантним компонентама уља са нашим резултатима, као и између различитих врста истог рода, *A. crithmifolia* (артемизија кетон 31,7%, камфор 25,4%, 1,8-цинеол 14,8%) и *A. millefolium* (артемизија кетон 14,92%, камфор 11,64%, линалил ацетат 11,51% и 1,8-цинеол 10,15%) (Chou и сар., 2013).

5.1.1.3. Хемијски састав етарског уља врсте *Angelica panicii*

Биљни материјал *A. panicii* Vand. је прикупљен на Власинском језеру (место Црна Трава) у фази пуног цвета, у току лета 2012. и 2013. године. Након сушења надземних делова, поступком хидродестилације у апарату по Клевинцеру изоловано је 0,14% (v/w) уља. Комбинацијом ГХ и ГХ/МС анализе у етарском уљу врсте *A. panicii*

идентификовано је 40 компоненти тј. 98,8% етарског уља. Квалитативни и квантитативни састав овог етарског уља је представљен у **табели 5-4**.

Табела 5-4. Хемијски састав етарског уља врсте *Angelica panicicii*

Ред. бр.	Једињење	Садржај у %	Р _и	Р _Л
1	3-метил-2-бутен-1-ол	0,3	780	765
2	(Е)-2-хексенал	Тр	850	846
3	(Е)-2-хексенол	Тр	861	854
4	нонан	0,1	899	900
5	α-тујен	0,3	927	924
6	α-пинен	14,5	935	932
7	камфен	1,6	950	946
8	3-метил нонан	0,2	971	970
9	сабинен	0,5	975	969
10	β-пинен	0,7	979	974
11	мирцен	3,8	992	988
12	δ-2-карен	0,2	1003	1001
13	α-феландрен	4,5	1007	1002
14	δ-3-карен	4,4	1013	1008
15	α-терпинен	0,2	1019	1014
16	п-цимен	0,1	1024	1020
17	о-цимен	1,9	1026	1022
18	β-феландрен	54,9	1031	1025
19	(З)-β-оцимен	0,7	1039	1032
20	(Е)-β-оцимен	1,4	1049	1044
21	γ-терпинен	0,2	1060	1054
22	α-терпинолен	0,4	1090	1086
23	изопентил 2-метил бутаноат	0,3	1105	1100
24	изопентилизовалерат	0,5	1108	1102
25	п-мент-2-ен-1-ол	0,5	1123	1117
26	транс-п-мент-2-ен-1-ол	0,3	1141	1136
27	камфор	0,2	1148	1141
28	криптон	0,1	1190	1183
29	цис-пиперитол	0,1	1197	1195
30	транс-пиперитол	0,1	1209	1207
31	борнил ацетат	1,3	1289	1287
32	транс-кариофилен	Тр	1427	1417
33	β-цедрен	0,2	1429	1419
34	акора-3,5-диен	0,2	1432	1425
35	(Е)-β-фарнесен	Тр	1463	1454
36	γ-муролен	0,1	1479	1478
37	гермакрен Д	0,2	1489	1484
38	глобулол	0,1	1593	1584
39	акоренол Б	3,6	1670	1654
40	акоренон Б	0,1	1700	1697
Укупно		98,8		
Терпеноиди		98,2		
Монотерпенски угљоводоници		90,3		
Оксигеновани монотерпени		3,4		
Сесквитерпенски угљоводоници		0,7		
Оксигеновани сесквитерпени		3,8		
Остало		0,6		

* Једињења су наведена по редоследу елуирања на ХП-5МС колони (Р_Л: литературни ретенциони индекс, Р_и: експериментално одређен ретенциони индекс)

Главне компоненте етарског уља *A. panicicii* су β-феландрен (54,9%), α-пинен (14,5%) и α-феландрен (4,5%), док су у мањој мери присутни и δ-3-карен (4,4%),

мирцен (3,8%), акоренол Б (3,6%), о-цимен (1,9%), камфен (1,6%), (Е)- β -оцимен (1,4%), борнил ацетат (1,3%) (график 5-3).

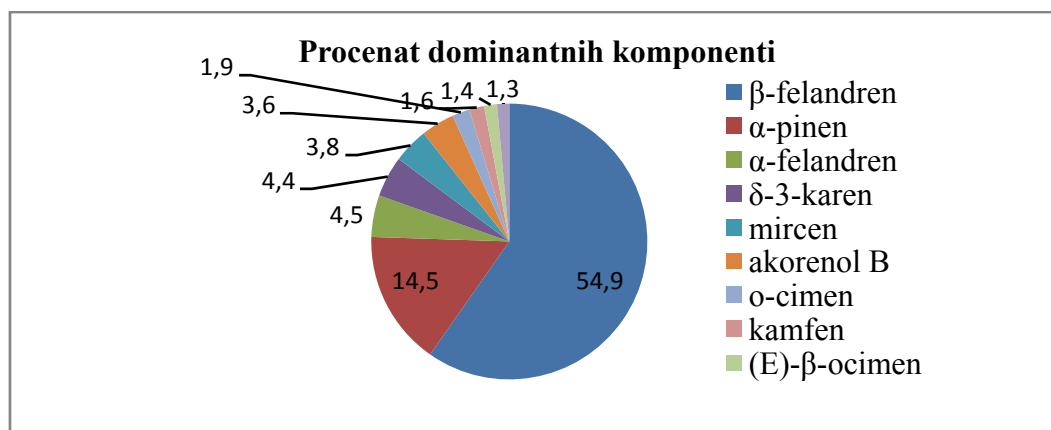


График 5-3. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте *A. paniculata*

Хемијски састав врсте *A. paniculata* је први пут описан у извештају Симоновић и сар., (2014). У овом етарском уљу, користећи две методе, као доминантне компоненте су детектоване β -феландрен (54,9% и 60,1%), α -пинен (14,5% и 20,1%) и α -феландрен (4,5% и 4,3%) (график 5-3)

5.1.1.4. Хемијски састав етарског уља врсте *Angelica sylvestris*

Биљни материјал *A. sylvestris* L. је прикупљен у реону Димитровграда (село Мазгош) у фази пуног цвета, у току лета 2012. и 2013. године. Након сушења надземних делова, поступком хидродестилације у апарату по Клевинцеру изоловано је 0,05% (v/w) уља. Комбинацијом ГХ и ГХ/МС анализе у етарском уљу врсте *A. sylvestris* L. идентификоване су 32 компоненте тј. 97,4% етарског уља. Квалитативни и квантитативни састав овог етарског уља је презентован у **табели 5-5**.

Табела 5-5. Хемијски састав етарског уља врсте *Angelica sylvestris*

Ред. бр.	Једињење	Садржај у %	Ри	РЛ
1	3-метил-2-бутенал	0,2	778	780
2	хексанал	0,1	801	800
3	5,5-диметил-1-етил-1,3-циклопентадиен,	0,3	835	832
4	2Е-хексенал	0,2	846	850
5	нонан	0,2	900	899
6	α -тујен	0,0	924	927
7	α -пинен	9,6	932	935
8	камфен	0,8	946	950
9	3-метил-нонан,	0,2	970	971
10	сабинен	1,2	969	975
11	β -пинен	0,5	974	979
12	6-метил-5-хептен-2-он	0,2	981	988
13	мирцен	1,2	988	992
14	2,4,4-триметилпентил естар метаноат	0,6	1007	1004
15	о-цимен	1,4	1022	1027
16	лимонен	75,3	1024	1031
17	мента-2,8-диен-1-ол<транс-пара->	0,2	1119	1122
18	цис-лимонен оксид	1,2	1132	1136
19	транс-лимонен оксид >	0,4	1137	1140
20	камфор	1,2	1141	1148
21	2-метил-4-метилпентил бутаноат	0,1	1197	1200
22	транс-карвеол	0,1	1215	1221
23	транс-хризантенил ацетат>	0,2	1235	1238
24	карвон	0,2	1239	1246
25	тимол	0,4	1290	1281
26	борнил ацетат	0,1	1287	1289
27	2-метил-4-метилхексил бутаноат	0,2	1304	1307
28	лонгипинен	0,1	1350	1358
29	β -елемен	0,5	1389	1396
30	транс-кариофилен	0,3	1417	1427
31	дехидро-сесквицинеол	0,3	1469	1474
32	α -бисаболол	0,1	1685	1691
Укупно		97,4		
Терпеноиди		95,3		
Монотерпенски угљоводоници		90,1		
Оксигеновани монотерпени		4,0		
Сесквитерпенски угљоводоници		0,8		
Оксигеновани сесквитерпени		0,4		
Остало		2,1		

* Једињења су наведена по редоследу елуирања на ХП-5МС колони (РЛ: литературни ретенциони индекс, Ри: експериментално одређен ретенциони индекс)

Етарско уље *A. sylvestris* карактерише изражено присуство лимонена (75,3%) и α -пинена (9,6%), а затим и орто-цимена (1,4%), сабинена (1,2%), мирцена (1,2%), цис-лимонен оксида (1,2%) и камфора (1,2%), док су остале компоненте биле присутне у концентрацијама мањим од 1% (график 5-4).

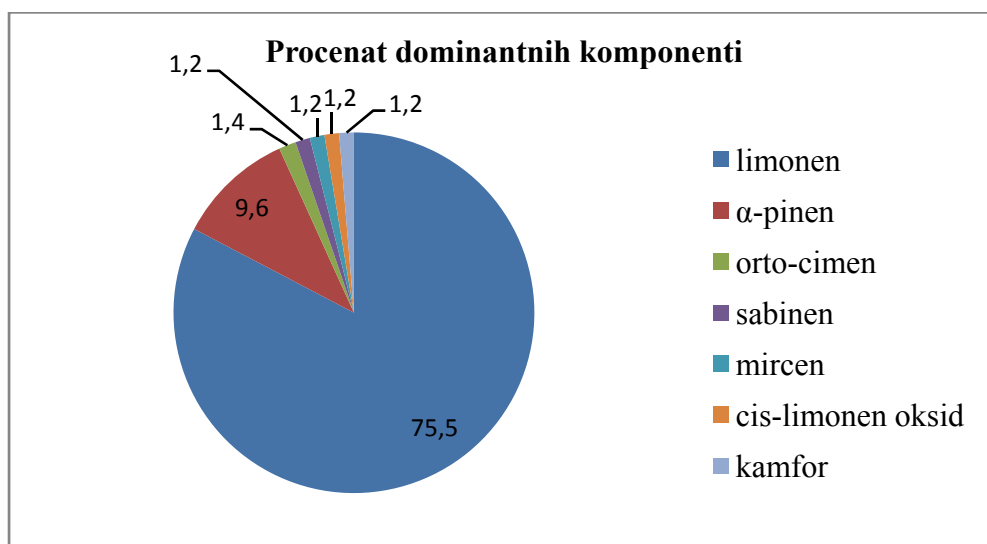


График 5-4. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте *A. sylvestris*

У ранијим студијама које су се бавиле хемијским саставом етарског уља *A. sylvestris* утврђен је висок проценат α-пинена (24,65%) и β-феландрена (42,96%) у надземним деловима биљака (Evergetis и сар., 2012) и трицикличног хамазулена у корену биљке (Vinokurova и сар., 1999). У анализи етарског уља из плодова врсте *A. sylvestris*, у зависности од метода његовог изоловања детектовано је присуство α-пинена (25,6%, 36,2% и 9,2%), β-феландрена (9,1%, 9,9% и 3,2%), борнил ацетата (7,3%, 4,3% и 6,9%) и лимонена (5,6%, 4,3% и 2,1%) (Ozek и сар., 2008)

5.1.1.5. Хемијски састав етарског уља врсте *Artemisia absinthium*

Биљни материјал *A. absinthium* L. је прикупљен у реону Нишке Бање (село Малча) у периоду пуног цветања, у току лета 2012. и 2013. године. Након сушења надземних делова, поступком хидродестилације у апарату по Клевинџеру изоловано је 0,12% (v/w) уља. Комбинацијом ГХ и ГХ/МС анализе у етарском уљу врсте *A. absinthium* идентификовано је 53 једињења тј. 96,2% етарског уља. Квалитативни и квантитативни састав овог етарског уља је представљен у **табели 5-6**.

Табела 5-6. Хемијски састав етарског уља врсте *Artemisia absinthium*

Ред. бр.	Једињење	Садржај у %	Ри	РЛ
1	хексанал	0,1	800	801
2	(Е)-2-хексенал	0,1	850	846
3	7-метил-1-октен,	0,2	852	852
4	н-хексано	0,2	864	863
5	α -тујен	0,5	927	924
6	α -пинен	0,5	935	932
7	α -фенхен	5,6	949	945
8	бенз алдехид	0,1	961	952
9	сабинен	21,5	976	969
10	β -пинен	0,5	979	974
11	мирцен	2,3	992	988
12	α -феландрен	1,6	1007	1002
13	α -терпинен	0,2	1019	1014
14	орто-цимене	19,2	1027	1022
15	β -феландрен	0,6	1031	1025
16	1,8-цинеол	0,4	1034	1026
17	β -(3)-оцимен	0,3	1039	1032
18	бензен ацеталдехид	0,2	1045	1036
19	γ -терпинен	0,6	1060	1054
20	сабинен хидрат	0,3	1069	1071
21	цис-линалол оксид	0,1	1074	1067
22	терпинолен	0,2	1090	1086
23	линалол	2,0	1100	1095
24	н-нонанал	0,1	1104	1100
25	цис-тујон	0,2	1108	1101
26	транс-тујон	9,1	1119	1112
27	п-мент-2-ен-1-ол	0,7	1123	1122
28	(3)-епокси-оцимен	11,0	1133	1128
29	(Е)-епокси-оцимен	0,9	1141	1137
30	камфор	2,2	1151	1141
31	сабина кетон	0,4	1161	1154
32	лавандулол	1,5	1168	1165
33	розефуран епоксид	0,2	1176	1173
34	терпинен-4-ол	3,3	1180	1174
35	п-цимен-8-ол	0,7	1187	1179
36	α -терпинеол	0,2	1193	1186
37	миртенол	Тр	1195	1194
38	метил салицилат	0,2	1198	1190
39	фрагранол	0,2	1216	1214
40	нерол	0,2	1229	1227
41	транс-хризантхенил ацетат	0,7	1238	1235
42	кумин алдехид	0,3	1244	1238
43	борнил ацетат	1,5	1289	1287
44	лавандулил ацетат	0,6	1291	1288
45	фрагранил ацетат	1,3	1346	1331
46	нерил ацетат	0,1	1365	1359
47	лавандулил изобутаноат	0,7	1424	1421
48	транс-кариофилен	0,2	1427	1417
49	β -целинен	0,2	1495	1489
50	лавандулил изовалерат	1,1	1511	1509
51	лавандулил 2-метил бутаноат	0,8	1512	1511
52	нерил изовалерат	0,3	1585	1582
53	кариофилен оксид	0,2	1592	1582
Укупно		96,2		
Терпеноиди		95,3		
Монотерпенски угљоводоници		66,4		
Оксигеновани монотерпени		28,3		
Сесквитерпенски угљоводоници		0,4		
Оксигеновани сесквитерпени		0,2		
Остало		0,9		

* Једињења су наведена по редоследу елуирања на ХП-5МС колони (РЛ: литературни ретенциони индекс, Ри: експериментално одређен ретенциони индекс)

Етарско уље *A. absinthium* као доминантне компоненте садржи сабинен (21,5%), орто-цимен (19,2%) и (з)-епокси-оцимен (11,0%), док су у мањој концентрацији присутни још и транс-тујон (9,1%), α - фенхен (5,6%), терпинен-4-ол (3,3%), мирцен (2,3%), камфор (2,2%), линалол (2,0%), α -феландрен (1,6%), борнил ацетат (1,5%), лавандулол (1,5%), фрагранил ацетат (1,3%), лавандунил изовалерат (1,1%). Остала јединицења су детектована у концентрацији мањој од 1% (график 5-5).

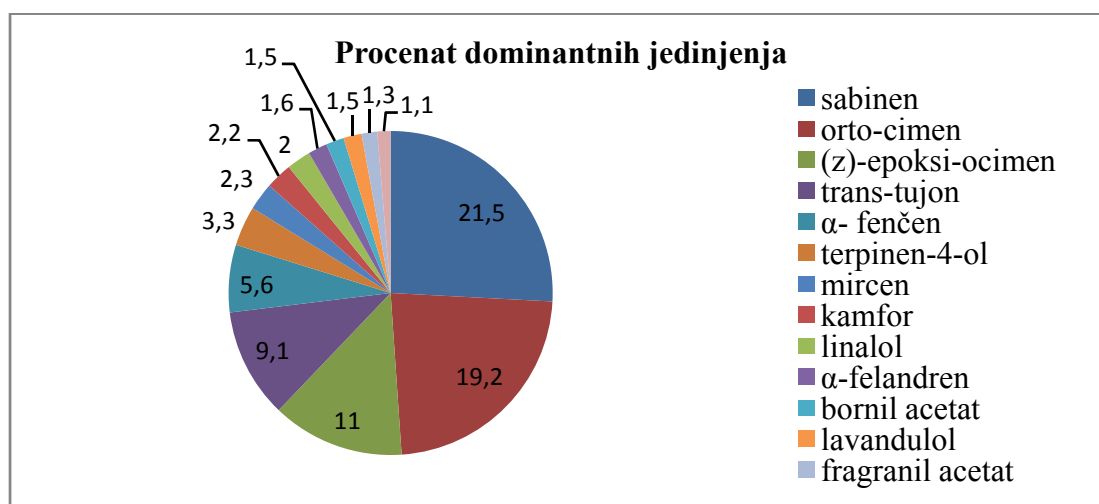


График 5-5. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте *A. absinthium*

Принос уља биљне врсте *A. absinthium* у досадашњим истраживањима се кретао од 0,1 до 2,3% v/w (Juteau и сар., 2003, Orav и сар., 2006, Rezaeinodehi, Khangholi, 2008, Baykan Erel и сар., 2012, Judzentiene и сар., 2012), одакле се може закључити да је принос уља из нашег биљног материјала доста низак (0,12% v/w) (Станковић и сар., 2016). На основу досадашњих истраживања доказано је да хемијски састав етарског уља *A. absinthium* варира у односу на поднебље на коме расте. Тако је у обимној студији која се бавила испитивањем хемијског састава уља *A. absinthium* са различитих географских подручја у Европи уочено да су главне компоненте у уљима из Естоније били монотерпени (сабинен и мирцен – 21,2% и 25,6%), као и у Мађарској, Шкотској, Молдавији (сабинен и мирцен – 9,2 и 38,9%), док је велика концентрација епоксидицимена (22,1%) пронађена у узорцима из Русије (Orav и сар., 2006). Чиалва са сарадницима (1983) је дефинисао неколико карактеристичних хемотипова уља *A. absinthium* која расте на различитим локалитетима у Европи: уља богата сабинином и мирценом, уља богата α - и β -тујоном, уља богата епоксидицименом и уља богата (E)-сабинином ацетатом. Такође су пронађене и неке мешавине ових хемотипова (Chialva и сар., 1983). У новије време су представљени нови хемотипови етарског уља *A. absinthium*: сабинином ацетат + тујони и сабинином ацетат + (з)-епоксидицимен из Литваније

(Judzentiene и сар., 2012); сабинен + мирцен + хризантенил ацетат из Турске (Baykan Erel и сар., 2012); β -пинен + β -тујон (Rezaeinodehi, Khangholi, 2008); (3)-епоксиоцимен + хризантенил ацетат из Француске и β -тујон + (3)-епоксиоцимен из Хрватске (Juteau и сар., 2003); чист β -тујон хемотип и β -тујон + цис-епоксиоцимен хемотип (Благојевић и сар., 2006) и сабинен + α -феландрен + сабинил ацетат (Михајилов-Крстев и сар., 2014) из Србије. У истраживањима уља из узорак са локалитета у Индији као главне компоненте уља су детектоване борнеол + метил хиокинат + изоборнил ацетат + β -гурјунен + кариофилен оксид (Rajesh, 2013). У уљу нашег узорка *A. absinthium* (сабинен + орто-цимен + (3)-епокси-оцимен), друга компонента по значају орто-цимен се не налази у значајном проценту ни у једном од наведених хемотипова (Станковић и сар., 2016)

5.1.1.6. Хемијски састав етарског уља врсте *Hyssopus officinalis*

Биљни материјал *Hyssopus officinalis* L. је прикупљен у реону места Височка Ржана (село Рсовци), у вегетативној фази, у току лета 2012. и 2013.. године. Након сушења надземних делова, поступком хидродестилације у апарату по Клевинџеру изоловано је 0,17% (v/w) уља. Комбинацијом ГХ и ГХ/МС анализе у етарском уљу врсте *H. officinalis* L. идентификована су 43 једињења тј. 98,60% етарског уља. Квалитативни и квантитативни састав овог етарског уља је представљен у **табели 5-7**.

Табела 5-7. Хемијски састав етарског уља врсте *Hyssopus officinalis*

Ред. бр.	Једињење	Садржај у %	Ри	РЛ
1	α -тујен	0,1	927	924
2	α -пинен	1,1	935	932
3	камфен	0,1	950	946
4	сабинен	1,3	975	969
5	β -пинен	11,3	979	974
6	мирцен	0,6	993	988
7	α -феландрен	Тр	1007	1002
8	α -терпинен	0,2	1019	1014
9	орто-цимен	0,5	1027	1022
10	лимонен	1,5	1031	1024
11	1,8-цинеол	49,1	1034	1026
12	(3)- β -оцимен	2,5	1039	1032
13	(Е)- β -оцимен	0,4	1049	1044
14	γ -терпинен	0,4	1060	1054
15	артемизија кетон	0,4	1062	1056
16	цис-сабинен хидрат	0,1	1069	1065
17	камфенилон	0,1	1087	1078
18	терпинолен	0,2	1090	1086
19	линалол	0,1	1100	1095
20	α -тујон	0,2	1108	1101
21	β - тујон	Тр	1119	1112
22	α -камфоленал	0,1	1129	1122
23	алооцимен	Тр	1130	1128
24	нопинон	0,6	1141	1135
25	транс-пинокарвеол	0,5	1142	1135
26	камфор	0,5	1151	1141
27	транс-пинокамфон	1,2	1164	1158
28	пинокарвон	0,3	1166	1160
29	борнеол	0,1	1170	1165
30	изопинокамфон	22,7	1178	1172
31	терпинен-4-ол	0,8	1180	1174
32	п-цимен-8-ол	0,1	1187	1179
33	криптон	Тр	1189	1183
34	α -терпинеол	0,2	1193	1186
35	миртенал	0,9	1200	1195
36	карвотанацетон	0,1	1251	1244
37	метил миртенат	0,1	1300	1293
38	миртенил ацетат	Тр	1330	1324
39	β -бурбонен	0,2	1392	1387
40	транс-кариофилен	0,1	1427	1417
41	γ -муролен	0,1	1489	1478
42	бициклогермакрен	0,2	1504	1500
43	спатуленол	Тр	1586	1577
Укупно		99,0		
Терпеноиди		98,9		
*	Монотерпенски угљоводоници	20,2		
	Оксигеновани монотерпени	78,1		
	Сесквитерпенски угљоводоници	0,6		
	Оксигеновани сесквитерпени	-		
	Остало	0,1		

Једињења су наведена по редоследу елуирања на ХП-5МС колони (РЛ: литературни ретенциони индекс, Ри: експериментално одређен ретенциони индекс)

У етарском уљу биљне врсте *H. officinalis* као доминантне компоненте налазе се 1,8-цинеол (49,1%) и изопинокамфон (22,7%), затим β -пинен (11,3%), (3)- β -оцимен

(2,5%), транс-пинокамфон (1,2%), док су остале компоненте заступљене у концентрацији мањој од 1% (график 5-6).

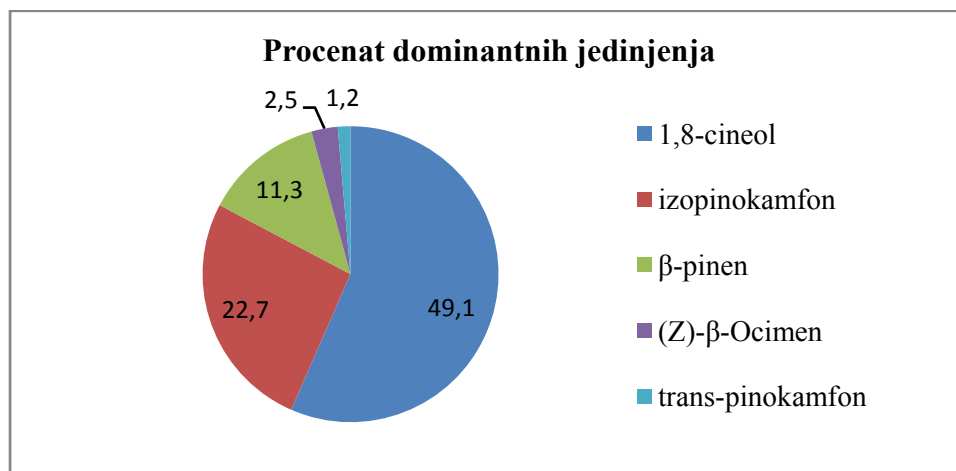


График 5-6. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте *H. officinalis*

Принос уља биљне врсте *H. officinalis* у испитиваном узорку (0,17 % v/w) је знатно нижи у поређењу са узорком са другог локалитета у Србији (0,5 % v/w) (Митић, Ђорђевић, 2000). Изопинокамфон, присутан у нашем узорку са великим уделом (22,7 %), се налази и у раније истраживаним узорцима етарског уља *H. officinalis* са локалитета у Италији, Ирану и Турској (43,3% 57,27% и 22,1%) (Mazzanti и сар., 1998; Kizil и сар., 2010; Mahboubi и сар., 2011). С друге стране, пинокамфон који је у ранијим истраживањима детектован у великом проценту (44,4%), као и варијетети цис – пинокамфон (42,5%) и транс – пинокамфон (14,1%) (Mazzanti и сар., 1998, Митић, Ђорђевић, 2000) у нашем уљу нису били присутни. Најприсутнија компонента у нашем узорку, 1,8-цинеол (49,1%) је била детектована само у узорку *H. officinalis* var. *decumbens* са локалитета у Француској (12,3 %) (Mazzanti и сар., 1998). Описано је и етарско уље *H. officinalis* са специфичним саставом: тимол (18,95%), β-бисаболол (10,62%), карвакрол (7,73%), н-додекан (5,23%), кариофилен (4,96%), орто-ацетанизол (4,72%), камфор (3,47%), кумин алдехид (3,22%) и спатуленол (3,02%) (Dehghanzadeh и сар., 2012). Неоубичајен хемијски састав овог уља доказује да разлике у саставу етарских уља могу настати због климатских, сезонских, географских и онтогенетских варијација (Alizadeh и сар., 2011).

5.1.1.7. Хемијски састав етарског уља врсте *Laserpitium latifolium*

Биљни материјал *L. latifolium* L. је прикупљен на Старој планини (врх Бабин зуб) у фази пуног цвета, у току лета 2012. и 2013. године. Након сушења надземних делова, поступком хидродестилације у апарату по Клевинцеру изоловано је 0,16% (v/w) уља. Комбинацијом ГХ и ГХ/МС анализе у етарском уљу врсте *L. latifolium* идентификовано је 26 једињења што је 98,9% етарског уља. Квалитативни и квантитативни састав овог етарског уља је презентован у **табели 5-8**.

Табела 5-8. Хемијски састав етарског уља врсте *Laserpitium latifolium*

Ред. бр.	Једињење	Садржај у %	Ри	РЛ
1	хексанал	Тр	800	801
2	α -тујен	0,4	927	924
3	α -пинен	25,0	935	932
4	камфен	0,8	950	946
5	сабинен	47,8	975	969
6	β -пинен	7,1	979	974
7	мирцен	2,0	992	988
8	н-октанал	Тр	1004	998
9	α -феландрен	0,1	1007	1002
10	α -терпинен	1,1	1019	1014
11	орто-цимен	0,6	1027	1022
12	β -феландрен	3,3	1031	1025
13	β -(3)-оцимен	0,1	1039	1032
14	бензен ацеталдехид	0,1	1045	1036
15	γ -терпинен	2,7	1060	1054
16	сабинен хидрат	0,6	1069	1071
17	терпинолен	0,4	1090	1086
18	п-мент-2-ен-1-ол	0,2	1123	1122
19	α -камфоленал	0,1	1129	1122
20	камфор	0,6	1151	1141
21	борнеол	0,1	1169	1165
22	терпинен-4-ол	5,5	1180	1174
23	α -терпинеол	0,2	1193	1186
24	миртена	0,1	1200	1195
25	вербенон	0,1	1213	1204
26	борнил ацетат	0,1	1289	1287
Укупно		99,9		
Терпеноиди		99,8		
Монотерпенски угљоводоници		91,4		
Оксигеновани монотерпени		8,4		
Сесквитерпенски угљоводоници		0,1		
Оксигеновани сесквитерпени		0,1		
Остало		тр.		

* Једињења су наведена по редоследу елуирања на ХП-5МС колони (РЛ: литературни ретенциони индекс, Ри: експериментално одређен ретенциони индекс)

У етарском уљу биљне врсте *L.latifolium* као доминантне компоненте заступљени су сабинен (47,8%) и α -пинен (25,0%), затим β -пинен (7,1%), терпинен-4-ол (5,5%), β -феландрен (3,3%), γ -терпинен (2,7%), мирцен (2,0%), α -терпинен (1,1%), док су остале компоненте заступљене у концентрацији мањој од 1% (**график 5-7**).

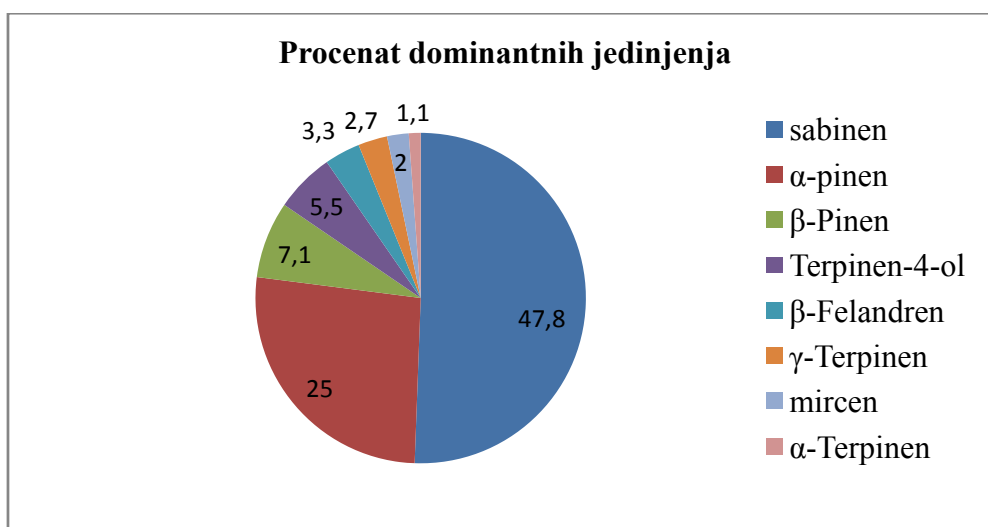


График 5-7. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте *L. latifolium*

У једном од малобројних објављених радова анализирана су етарска уља изолована из подземних органа и плодова *L. latifolium* и *L. ochridanum*, као и из хербе *L. ochridanum* (Поповић и сар., 2015). Као и у нашим резултатима (сабинен 47,8% и α -пинен 25,0%), у уљима доминирају монотерпени, а доминатне компонентне су биле: α -пинен и сабинен (44,0% и 26,8%) у уљу плода *L. latifolium*, α -пинен (44,4%) у уљу подземних органа *L. latifolium* и лимонен (57,7%) у уљу плода *L. ochridanum*. У уљу поземних органа *L. ochridanum* удео монотерпена и сесквитерпена је приближан (α -пинен 44,4%, хамазулен 14,9%, α -бисаболол 10,3%).

5.1.1.8. Хемијски састав етарског уља врсте *Tanacetum parthenium*

Биљни материјал *T. parthenium* L. Schultz Bip. је прикупљен на Старој планини (врх Бабин зуб) у фази пуног цвета, у току лета 2012. и 2013. године. Након сушења надземних делова, поступком хидродестилације у апарату по Клевинџеру изоловано је 0,57% (v/w) уља. Комбинацијом ГХ и ГХ/МС анализе у етарском уљу врсте *T. parthenium* идентификовано је 55 компоненти тј. 97,9% етарског уља. Квалитативни и квантитативни састав овог етарског уља је представљен у **табели 5-9**.

Табела 5-9. Хемијски састав етарског уља врсте *Tanacetum parthenium*

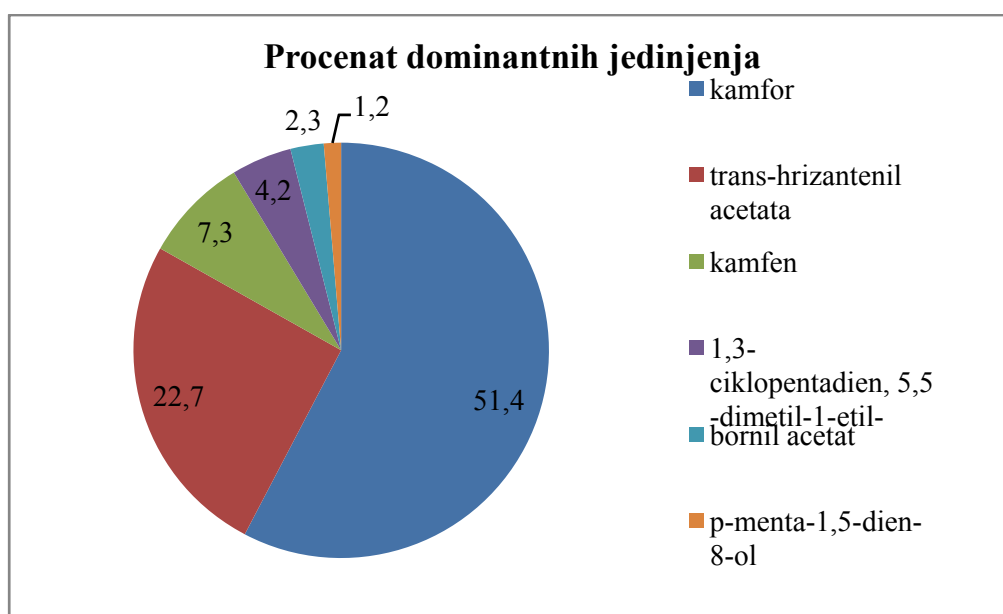
Ред. бр.	Једињење	Садржај у %	RI	PL
1	хексанал	0,1	800	801
2	5,5-диметил-1-етил-1,3-циклопентадиен -	4,2	831	812
3	1,2,5,5-тетраметил-1,3-циклопентадиен	0,4	842	840
4	(Е)-2-хексенал	Тр	850	846
5	н-хексанол	Тр	864	863
6	хептанал	Тр	901	901
7	трициклен	0,4	923	921
8	α-тујен	0,1	927	924
9	α-пинен	0,7	935	932
10	камфен	7,3	950	946
11	туја-2,4(10)-диен	0,2	956	953
12	бензалдехид	0,2	961	952
13	сабинен	0,2	975	969
14	β-пинен	0,2	979	974
15	мезитилен	0,5	996	994
16	н-октанал	Тр	1004	998
17	(2Е,4Е)-2,4-хептадиенал	Тр	1012	1005
18	α-терпинен	0,1	1019	1014
19	1,2,4-триметилбензен	0,3	1025	1021
20	орто-цимен	0,7	1027	1022
21	лимонен	0,2	1031	1024
22	1,8-цинеол	Тр	1034	1026
23	бензен ацеталдехид	0,1	1045	1036
24	γ-терпинен	0,2	1060	1054
25	сабинен хидрат	0,1	1069	1071
26	н-октанол	Тр	1070	1063
27	терпинолен	0,1	1090	1086
28	линалол	0,2	1100	1095
29	филифолон	0,1	1105	1109
30	транс-хризантенол	0,5	1118	1114
31	хризантенол	0,2	1128	1124
32	α-камфоленал	Тр	1129	1122
33	транс-пинокарвеол	0,2	1144	1135
34	камфор	51,4	1151	1141
35	пинокарвон	0,3	1166	1160
36	п-мента-1,5-диен-8-ол	1,2	1169	1166
37	терпинен-4-ол	0,5	1180	1174
38	п-цимен-8-ол	0,1	1187	1179
39	транс-п-мента-1(7),8-диен-2-ол	0,1	1190	1187
40	α-терпинеол	0,1	1193	1186
41	миртенал	0,1	1200	1195
42	транс-пиперитол	Тр	1210	1207
43	вербенон	0,2	1213	1204
44	транс-карвеол	0,1	1222	1215
45	цис-п-мента-1(7),8-диен-2-ол	0,1	1231	1227
46	транс-хризантенил ацетат	22,7	1239	1235
47	карвон	0,1	1247	1239
48	цис-хризантенил ацетат	0,1	1264	1261
49	борнил ацетат	2,3	1289	1287
50	(2Е,4Е)-декадиенал	Тр	1318	1315
51	миртенил ацетат	0,1	1328	1324
52	фенил-метил пентаноат	0,1	1397	1396
53	изоборнил изовалерат	0,1	1523	1521
54	борнил ангелат	1,0	1568	1564
55	кариофилен оксид	0,2	1593	1582
Укупно		97,9		
Терпеноиди		93,3		
Монотерпенски угљоводоници		11,2		
Оксигеновани монотерпени		81,9		

Табела 5-9. Хемијски састав етарског уља врсте *Tanacetum parthenium*-наставак

Ред. бр.	Једињење	Садржај у %	Ри	РЛ
	Терпеноиди			
	Сесквитерпенски угљоводоници	-		
	Оксигеновани сесквитерпени	-		
	Остало	4,6		

* Једињења су наведена по редоследу елуирања на ХП-5МС колони (РЛ: литературни ретенциони индекс, Ри: експериментално одређен ретенциони индекс)

У етарском уљу *T. parthenium* доминатно је присуство камфора (51,4%), транс-хризантенил ацетата (22,7%) и камфена (7,3%). Такође, присутни су и 5,5-диметил-1-етил-1,3-циклопентадиен, (4,2%), борнил ацетат (2,3%), п-мента-1,5-диен-8-ол (1,2%), док се остала једињења налазе у концентрацији мањој од 1% (**график 5-8**).

График 5-8. Проценат доминантних једињења у етарском уљу врсте *T. parthenium*

Принос уља из различитих делова биљне врсте *T. parthenium* (надземни део, стабљика и лишће, цвасти, незрело и зрело сем) са локалитета у Ирану је био у опсегу од 0,31 до 6,94 % v/w (Izadi и сар., 2010) и знатно виши у односу на принос уља из нашег материјала (0,57% v/w) (Станковић и сар., 2016). Главне компоненте у тим узорцима уља су били камфор, транс-хризантенил ацетат и камфен. Доминатне компоненте у нашем узорку уља, камфор (51,4 %) и транс-хризантенил ацетат (22,7 %), појављују се и као доминантне у уљима изолованим из листова и цвасти исте врсте са једног локалитета у Египту (камфор 37,7 и 48,4%; транс-хризантенил ацетат 33,8 и 26,3%) (Rateb и сар., 2007); са једног локалитета у Турској (камфор 49,0%, транс-хризантенил ацетат 22,1%) (Polatoglu и сар., 2010); као и са четири локалитета у Ирану

(камфор 18,9, 10,3, 53,3 и 45,0%, транс-хризантенил ацетат (4,3, 22,5 и 21,5%) (Mohsenzadeh и сар., 2011; Izadi и сар., 2010; 2013). Трећа значајна компонента присутна у нашем узорку уља *T. parthenium*, камфен (7,3%), налази се и у уљима са два локалитета у Турској (9,4 и 6,8 %) (Polatoglu и сар., 2010) и три локалитета у Ирану (4,1, 10,4 и 9,6%) (Izadi и сар., 2010; 2013).

На основу резултата о хемијском саставу етарских уља испитиваних биљних врста можемо закључити да су доминатне компоненте у њима, биле: камфор (51,4% у уљу *T. parthenium*, 45,4% у уљу *A. grandifolia* и 25,4% у уљу *A. crithmifolia*), сабинен (47,8% у уљу *L. latifolium* и 21,5% у уљу *A. absinthium*), 1,8-цинеол (49,1% у уљу *H. officinalis*, 16,4% у уљу *A. grandifolia* и 14,8% у уљу *A. crithmifolia*), артемизија кетон (31,7% у уљу *A. crithmifolia*), α -пинен (25,0% у уљу *L. latifolium*, 14,5% у уљу *A. panicii* и 9,6% у уљу *A. sylvestris*), транс-хризантенил ацетат (22,7% у уљу *T. parthenium*), изопинокамфон (22,7% у уљу *H. officinalis*), орто-цимен (19,2% у уљу *A. absinthium*) и α -тујон (15,1% у уљу *A. grandifolia*), лимонен (75,3% у уљу *A. sylvestris*), β -феландрен (54,9% у уљу *A. panicii*) и α -феландрен (4,5% у уљу *A. panicii*). Квалитативни састав уља је показао и велико богатство етарских уља у различитим једињењима: *T. parthenium* (55 компоненти) и *A. absinthium* (53), а прате их етарска уља *H. officinalis* (43), *A. crithmifolia* (35), *A. grandifolia* (26) и *L. latifolium* (26). Заступљеност доминатних компоненти у етарским уљима је приказана у **графику 5-9**.

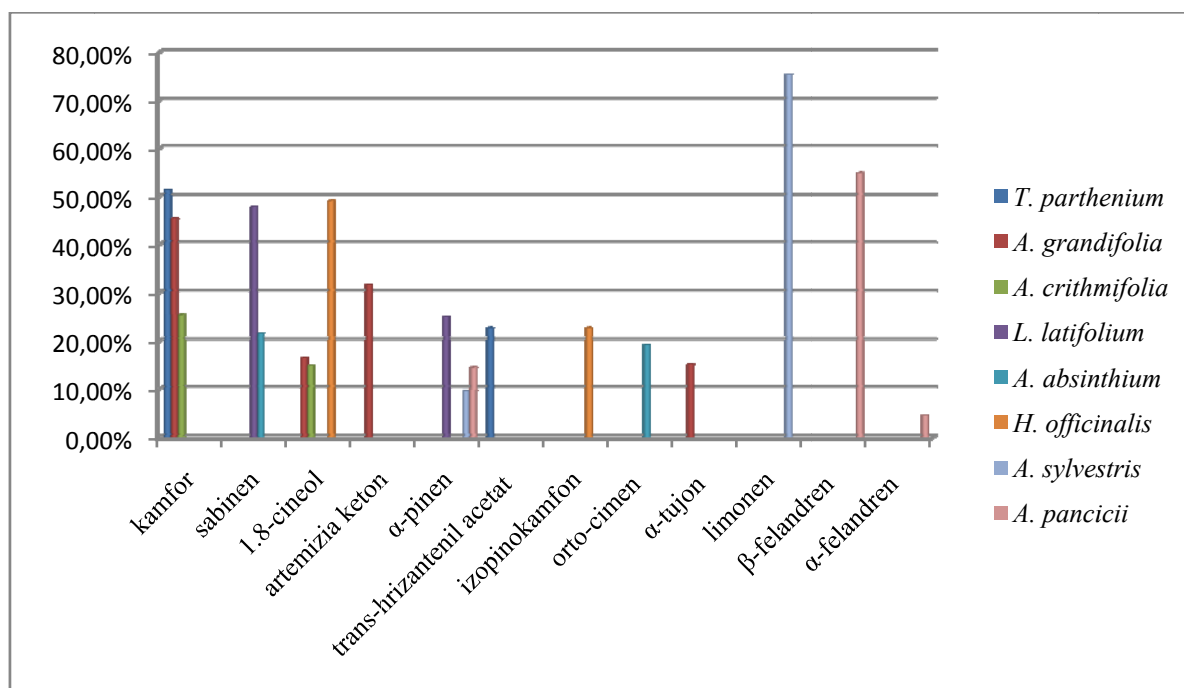


График 5-9. Заступљеност доминатних компоненти у анализираним етарским уљима

5.1.2. Компаративна анализа антиоксидативне активности етарских уља одабраних биљних врста

Антирадикалска и антиоксидативна активност етарских уља *A. absinthium*, *A. crithmifolia*, *A. grandifolia*, *T. parthenium*, *L. latifolium*, *H. officinalis*, *A. sylvestris*, *A. pancicii* је одређена применом ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) и DPPH (2,2-дифенил, 1-пикрил хидразил) метода. Резултати добијени овим методама су приказани у Табели 5-10.

Табела 5-10. Антиоксидативна активност етарских уља различитих биљних врста добијена применом DPPH и ABTS метода

Биљне фамилије	Биљне врсте	DPPH	ABTS
		IC ₅₀ (mg/mL)	mg VitC/g
Asteraceae	<i>Artemisia absinthium</i>	63,615±0,010	1,460±0,032
	<i>Achillea crithmifolia</i>	105,242±0,001	1,166±0,031
	<i>Achillea grandifolia</i>	33,575±0,069	2,510±0,036
	<i>Tanacetum parthenium</i>	240,184±0,002	0,349±0,007
Lamiaceae	<i>Hyssopus officinalis</i>	354,279±0,014	0,096±0,012
Apiaceae	<i>Laserpitium latifolium</i>	229,477±0,015	0,116±0,005
	<i>Angelica sylvestris</i>	110,081±0,002	2,74±0,002
	<i>Angelica pancicii</i>	155,081±0,007	2,15±0,003
Стандардни антиоксиданс	ВНА (0,10 mg/mL)	0,093±0,018	2,660±0,005
	Vitamin C	0,054±0,002	-

Свака вредност у табели је добијена израчунавањем средње вредности три понављања ± стандардна девијација

Најнижа IC₅₀ вредност код DPPH теста и највиша вредност код ABTS теста показују највећу антиоксидативну активност. На основу тога, најизраженију антиоксидативну активност је показало уље врсте *A. grandifolia*, али су и етарска уља врста *A. crithmifolia* и *A. absinthium* такође имала значајну антиоксидативну активност.

Најнижу активност је имало етарско уље врсте *H. officinalis*. Резултати DPPH и ABTS теста се подударају. Ово су први подаци о антиоксидативној активности етарских уља *L. latifolium*, *T. parthenium*, *A. crithmifolia*, *A. sylvestris* и *A. panicii*.

У ранијој студији, Павловић и сар. (2008), су користећи DPPH тест испитивали етарско уље *Achillea grandifolia* пореклом из југоисточне Србије (Сићевачка клисура) које је имало антирадикалску активност са вредношћу SC_{50} од 6 $\mu\text{L/mL}$. Наши резултати антиоксидативне активности етарског уља *Artemisia absinthium* из Србије су у сагласности са претходним истраживањем које су спровели Михајилов-Крстев и сар. (2014). Етарско уље биљне врсте *H. officinalis* прикупљене на терену у југоисточној Анадолији (Турска), је имало незнатно бољу активност од нашег узорка (Kizil и сар., 2010).

Резултати за ABTS тест су показали да се антиоксидативна активност кретала између 1,48 и 2,07 mg VitC/g за тестирану концентрацију од 30 $\mu\text{L/mL}$. Етарско уље *A. sylvestris* је показало бољу антиоксидативну активност од етарског уља *A. panicii*. Вредности IC_{50} код DPPH теста су се кретале између 50,895 и 149,498 mg/mL у наведеним концентрацијама. Као и у ABTS тесту етарско уље *A. sylvestris* је показало бољу антиоксидативну активност у поређењу са етарским уљем *A. panicii*. У истраживању које су спровели Рох и Шин (2014) потврђено је да етарско уље и две главне компоненте уља *A. koreana* поседује антиоксидативна својства. Једна од главних компоненти овог уља, м-крезол ($56,12 \pm 1,36\%$), је имала бољу активност од компоненте друге по заступљености, сабинена ($19,31 \pm 1,02\%$ и $4,45 \pm 1,06\%$) у концентрацији од 16 mg/mL. Међутим, резултати су показали слабију активност од контроле (ВНА - 3-терт-бутил-4-хидроксианизол). Активност ВНА је била 20 пута већа од тестираних узорка уља (Roh, Shin., 2014). Етарско уље *A. glauca* је испољило запажену антирадикалску активност са вредношћу IC_{50} од 32,32 $\mu\text{g/mL}$. Када се та активност упореди са синтетичким антиоксидансом ВНТ (бутиловани хидрокситолуен), примећује се да је она нешто слабија. Такође, проценат DPPH инхибиције је био мало нижи (93,9%) од инхибиције ВНТ (98,4%) (Irshad и сар., 2011).

5.1.3. Компаративна анализа антимикробне активности етарских уља одабраних биљних врста

У овом раду је 60 бактеријских клиничких изолата из брисева рана, грла, спутума и аспирата пацијената, прикупљених у Институту за јавно здравље у Нишу,

тестирано, антибиограм методом, на 19 стандардних антибиотика. На основу тако добијених резултата извршен је одабир 16 мултирезистентних сојева: *Escherichia coli* (брисеви рана, грла и аспират), *Pseudomonas aeruginosa* (брис ране и два изолата из спутума), *Klebsiella* sp. (брис ране и спутум), *Proteus mirabilis* (брис ране), *Acinetobacter* sp. (брис ране), *Staphylococcus aureus* (брис ране и носа), *Streptococcus pyogenes* (брис ране и грла), *Streptococcus pneumoniae* (брис носа) и *Enterococcus faecalis* (брис ране). На одабране сојеве је, уз помоћ микродилуционе методе, испитана антимикуробна активност етарских уља и метанолних екстраката осам одабраних ароматичних биљних врста. Као позитивна контрола коришћени су антибиотици: ципрофлоксацин (Ciprofloxacin), гентамицин (Gentamicin), еритромицин (Erythromycin) и доксициклин (Doxycycline), а као негативна контрола 0,1% водени раствор диметилсулфооксида (DMSO-a). Резултати антимикуробне активности за испитиване референтне антибиотике против одбраних мултирезистентних сојева су сумирани и приказани у **табели 5-11**.

Табела 5-11. Минималне инхибиторне и бактерицидне концентрација референтних антибиотика (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала

Изолувани бактеријски сојеви	Референтни антибиотици (MIC/MBC у mg/mL)			
	Ципрофлоксацин	Гентамицин	Еритромицин	Доксициклин
Брис ране				
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,63/0,63	0,30/0,30	10,00/10,00	10,00/>10,00
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,16/0,16	0,30/0,30	5,00/5,00	0,005/0,005
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,30/0,30	0,08/0,08	10,00/10,00	0,16/0,63
<i>Escherichia coli</i>	2,50/2,50	2,50/>10,00	10,00/>10,00	0,16/0,16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,02/0,63	2,50/10,00	10,00/10,00	0,16/0,63
<i>Acinetobacter</i> sp.	1,25/1,25	10,00/>10,00	10,00/10,00	0,16/0,16
<i>Proteus mirabilis</i>	10,00/>10,00	1,25/5,00	10,00/>10,00	0,16/1,25
<i>Klebsiella</i> sp.	0,63/>10,00	0,30/0,30	2,50/2,50	0,16/1,25
Брис носа				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,16/0,16	0,16/0,16	10,00/>10,00	0,08/0,08
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,08/0,08	0,16/0,16	10,00/10,00	0,005/0,005
Брис грла				
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,63/0,63	0,02/0,02	10,00/10,00	0,02/0,02
<i>Escherichia coli</i>	0,01/0,01	0,01/0,01	0,03/2,50	0,01/0,01
Спутум				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	0,02/0,02	0,16/0,16	2,50/2,50	0,02/0,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	0,04/0,04	0,02/0,04	5,00/10,00	0,08/0,30
<i>Klebsiella</i> sp.	1,25/1,25	0,30/0,30	0,30/0,30	0,30/0,30
Аспират				
<i>Escherichia coli</i>	0,02/0,02	0,30/0,63	0,16/1,25	0,01/0,01

Референтни антибиотици су изабрани на основу њихових разичитих механизма акције тј. антибактеријског деловања. Ципрофлоксацин (из групе флуорохинона) врши инхибицију дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) тако што инхибира ДНК синтезу инактивишући ензим ДНК гиразу једино у микроорганизмима. Антимикробна активност доксициклина (семисинтетски тетрациклински антибиотик) и гентамицина (из групе аминогликозида) је базирана на инхибицији синтезе протеина која се остварује њиховим везивањем за 30S субјединицу бактеријских рибозома и мењањем пермеабилности бактеријске цитоплазматске мембране. Еритромицин (из групе макролида) врши инхибицију синтезе протеина тако што се везује за 50S субјединицу бактеријских рибозома.

Одабрани антибиотици су деловали против свих испитиваних сојева у опсегу концентрација од 0,005 до 10,00 mg/mL. Доксициклин је показао најјачу антибактеријску активност у концентрацији од 0,005 mg/mL (против *S. pyogenes* и *S. aureus* из бриса ране и носа) и 0,01 mg/mL (против *E. coli* из бриса грла и аспирата). Овакво деловање доксициклина је очекивано с обзиром да је он антибиотик широког спектра деловања и да делује и на Грам (+) и на Грам (-) бактерије. Еритромицин је показао најслабију активност (код већег броја сојева је деловао у концентрацијама од 10,00 mg/mL или није деловао ни при тој највишој тестираној концентрацији). Слаба антибактеријска активност еритромицина се објашњава њиховим иначе познатим слабијим деловањем против појединих Грам (-) бактерија, као и појавом резистентности код Грам (+) сојева на овај антибиотик. Ципрофлоксацин је најбоље деловао против соја *E. coli* из бриса грла (MIC=MBC=0,01 mg/mL) и сојева *P. aeruginosa* (1) из спутума и *E. coli* из аспирата (MIC=MBC=0,02 mg/mL), док је гентамицин најјаче деловао против *E. coli* из бриса грла (MIC=MBC=0,01 mg/mL), као против *S. pyogenes* из бриса грла (MIC=MBC=0,02 mg/mL).

Из одабраних биљних врста припадника фамилија Lamiaceae (*Hyssopus officinalis*), Asteraceae (*Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Tanacetum parthenium* и *Artemisia absinthium*) и Apiaceae (*Laserpitium latifolium*, *Angelica sylvestris* и *Angelica panicicii*) су поступком хидродестилације изолована етарска уља. Њихова антимикробна активност је испитивана уз помоћ микродилуционе методе.

Етарска уља одабраних биљних врста су била ефикасна против свих тестираних бактеријских сојева. Минималне инхибиторне и бактерицидне концентрације су се кретале у опсегу концентрација од MIC=MBC=0,11/54,40 mg/mL (за уље *A. sylvestris*) и MIC=MBC=0,10/48,20 mg/mL (за уље *A. panicii*). Резултати ових анализа су сумирани и приказани у табели 5-12 и 5-13.

Табела 5-12. Антибактеријска активност етарских уља биљаних врста фамилија Ариасеае и Ламиасеае (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала

Изоловани бактеријски сојеви	Етарска уља (MIC/MBC у mg/mL)			
	<i>Laserpitim latifolium</i>	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Angelica sylvestris</i>	<i>Angelica Panicii</i>
Брисевни рана				
<i>Staphylococcus aureus</i>	42,10/42,10	22,15/44,30	13,60/27,20	6,03/12,06
<i>Streptococcus pyogenes</i>	42,10/42,10	88,60/88,60	54,40/54,40	6,03/6,03
<i>Enterococcus faecalis</i>	21,05/21,05	22,15/22,15	27,20/27,20	6,03/6,03
<i>Escherichia coli</i>	42,10/84,20	44,30/44,30	13,60/13,60	24,10/24,10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84,20/84,20	44,30/88,60	13,60/13,60	48,20/48,20
<i>Acinetobacter</i> sp.	10,52/21,05	22,15/22,15	0,11/0,22	0,10/0,10
<i>Proteus mirabilis</i>	21,05/84,20	44,30/88,60	0,87/0,87	12,05/12,05
<i>Klebsiella</i> sp.	84,20/84,20	88,60/88,60	0,87/0,87	24,10/24,10
Брисевни носа				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	42,10/42,10	22,15/22,15	54,40/54,40	24,10/24,10
<i>Staphylococcus aureus</i>	84,20/84,20	22,15/22,15	27,20/27,20	6,03/6,03
Брисевни грла				
<i>Streptococcus pyogenes</i>	21,05/21,05	22,15/22,15	54,40/54,40	12,05/12,05
<i>Escherichia coli</i>	42,10/42,10	44,30/44,30	1,70/1,70	24,10/24,10
Спутум				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	10,52/42,10	11,08/11,08	0,44/0,44	24,10/24,10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	42,10/42,10	44,30/88,60	0,44/0,44	12,05/12,05
<i>Klebsiella</i> sp.	10,52/21,05	11,08/22,15	1,70/1,70	24,10/24,10
Аспират				
<i>Escherichia coli</i>	21,05/42,10	44,30/44,30	3,40/3,40	12,05/12,05

Табела 5-13. Антибактеријска активност етарских уља биљних врста фамилије Asteraceae (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала

Изоловани бактеријски сојеви	Етарска уља (MIC/MBC у mg/mL)			
	<i>Tanacetum parthenium</i>	<i>Achillea grandifolia</i>	<i>Achillea crithmifolia</i>	<i>Artemisia absinthium</i>
Брисеви рана				
<i>Staphylococcus aureus</i>	46,60/93,20	23,08/46,15	21,45/21,45	9,45/18,90
<i>Streptococcus pyogenes</i>	23,30/23,30	11,54/11,54	5,36/5,36	37,80/37,80
<i>Enterococcus faecalis</i>	23,30/23,30	5,77/5,77	21,45/21,45	37,80/37,80
<i>Escherichia coli</i>	23,30/93,20	23,08/46,15	21,45/42,90	37,80/37,80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46,60/46,60	23,08/92,30	21,45/85,80	9,45/18,90
<i>Acinetobacter</i> sp.	23,30/46,60	23,08/23,08	21,45/21,45	4,72/4,72
<i>Proteus mirabilis</i>	93,20/93,20	46,15/46,15	42,90/85,80	9,45/9,45
<i>Klebsiella</i> sp.	93,20/93,20	46,15/46,15	42,90/42,90	18,90/18,90
Брисеви грла				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11,65/11,65	11,54/11,54	5,36/10,72	37,80/37,80
<i>Staphylococcus aureus</i>	46,60/46,60	23,08/46,15	21,45/85,80	9,45/9,45
Брисеви носа				
<i>Streptococcus pyogenes</i>	11,65/46,60	23,08/23,08	5,36/5,36	37,80/37,80
<i>Escherichia coli</i>	23,30/46,60	46,15/46,15	10,72/21,45	18,90/18,90
Спутум				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	23,30/46,60	11,54/11,54	10,72/21,45	4,72/4,72
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	46,60/93,20	46,15/46,15	42,90/42,90	18,90/18,90
<i>Klebsiella</i> sp.	11,65/23,30	11,54/23,08	10,72/10,72	18,90/18,90
Аспират				
<i>Escherichia coli</i>	46,60/46,60	23,08/23,08	21,45/21,45	18,90/18,90

Најјаче антибактеријско деловање показала су етарска уља биљних врста *A. sylvestris* и *A. panicii* (табела 5-12). Минималне инхибиторне и бактерицидне концентрације су се кретале у опсегу концентрација од MIC=MBC=0,10 до 54,40 за уље *A. sylvestris* и од 0,10 до 48,20 mg/mL за уље *A. panicii*. Генерално, етарско уље *A. sylvestris* је деловало боље против Грам (-) бактерија, а етарско уље *A. panicii* против Грам (+) бактерија.

Етарско уље *A. sylvestris* је у најнижим концентрацијама било активно против сојева *Acinetobacter* sp. (MIC/MBC=0,11/0,22 mg/mL), *P. mirabilis* и *Klebsiella* sp. (MIC=MBC=0,87 mg/mL) изолованих из брисева рана. Тако добра активност је забележена и против сојева *P. aeruginosa* 1 и 2 (MIC=MBC=0,44 mg/mL) и соја

Klebsiella sp. (MIC=MBC=1,7 mg/mL) изолованих из спутума. Уље је било ефикасно и против сојева *E. coli* изолованих из брисева грла и аспирата пацијената (MIC=MBC=1,70 и 3,40 mg/mL). У овим случајевима је етарско уље *A. sylvestris* деловало боље од већине тестираних антибиотика. Еритромицин је деловао најслабије у распону од 0,30 до 10 mg/mL, а најјаче доксициклин у опсегу од 0,02 до 1,25 mg/mL.

Треба подвући деловање овога уља против сојева *P. aeruginosa* из спутума јер његови сојеви на површини имају додатну хидрофилну мембрану која је непропустљива за уља, због чега су обично резистентни на њихово деловање. Резултати деловања етарског уља у односу на антибиотик су приказани на **графицима 5-10 и 5-11**.

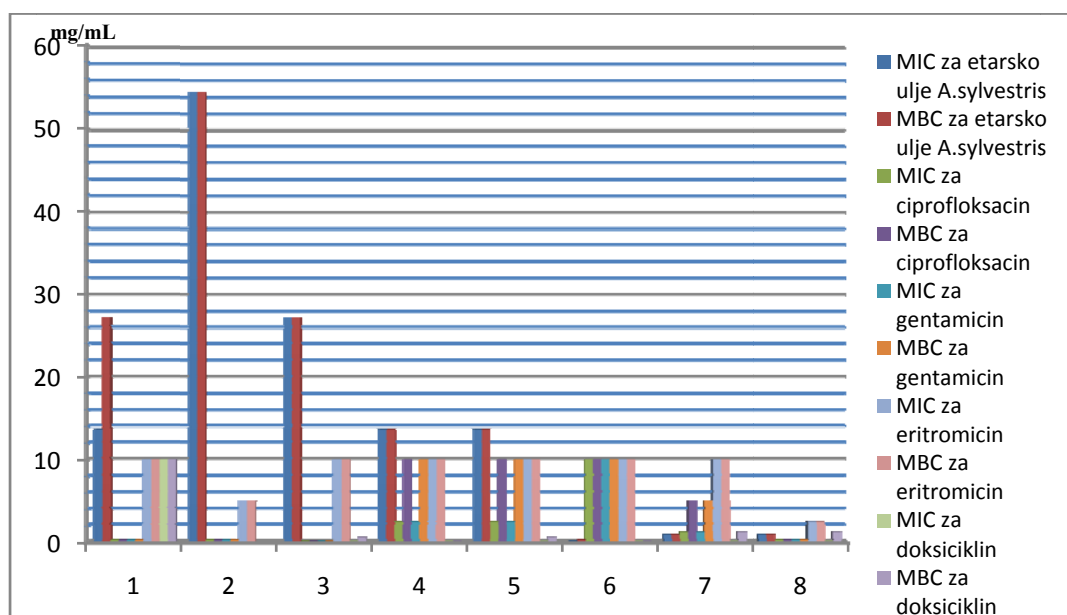


График 5-10. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Angelica sylvestris* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp.

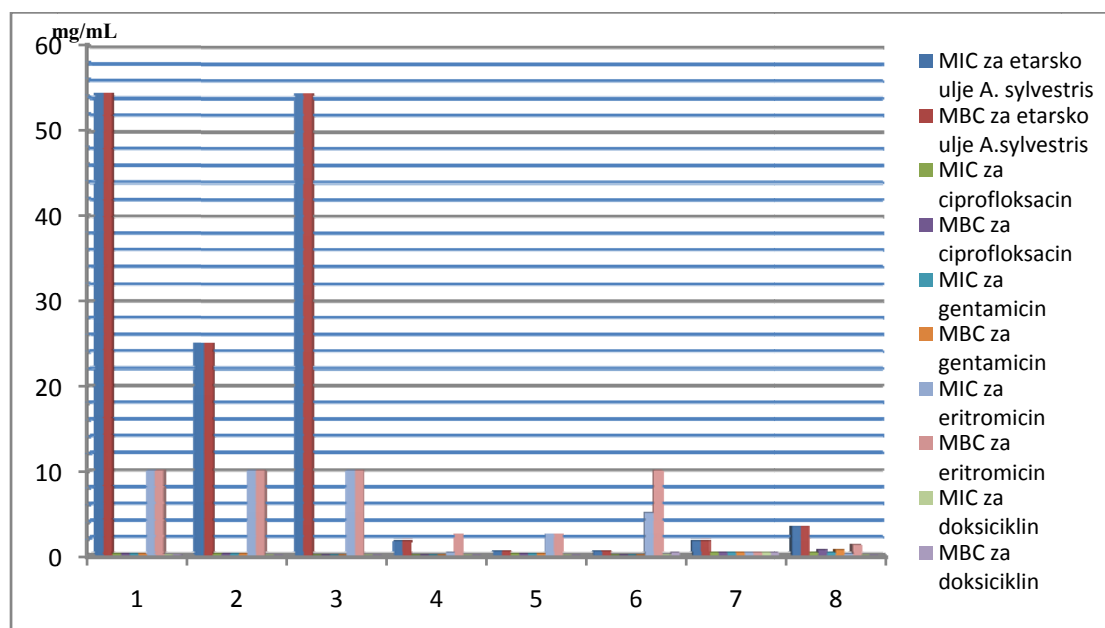


График 5.11. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Angelica sylvestris* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспирата: 8-*Escherichia coli*

Етарско уље *Angelica paniculata* је било најактивније против сојева *Acinetobacter* sp. (MIC=MBC=0,10 mg/mL), *S. pyogenes* и *E. faecalis* (MIC=MBC=6,03 mg/mL) који су изоловани из рана, као и против два соја *S. aureus*, који су изоловани из ране (MIC/MBC=6,03/12,06 mg/mL) и бриса носа (MIC=MBC=6,03 mg/mL). У овим случајевима су тестирани антибиотици деловали углавном слабије од етарског уља (најслабије, еритромицин у распону од 5-10 mg/mL, а најјаче, доксициклин у распону од 0,005-10 mg/mL). Резултати деловања етарског уља у односу на антибиотик су приказани на **графицима 5-12 и 5-13**.

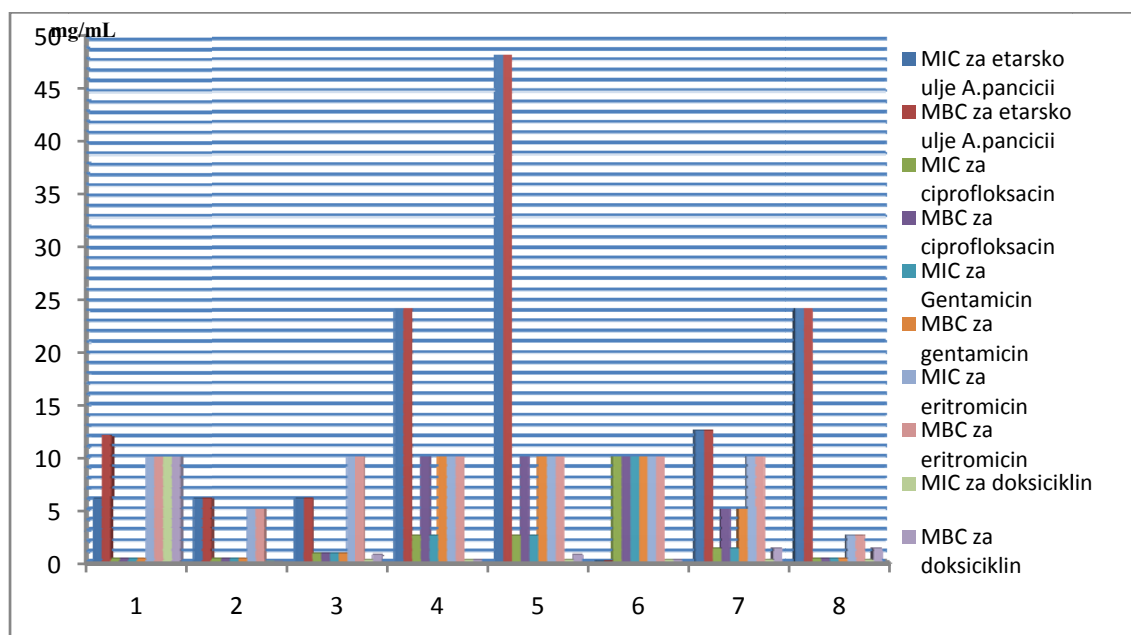


График 5-12. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Angelica panceicii* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолваних из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8-*Klebsiella* sp.

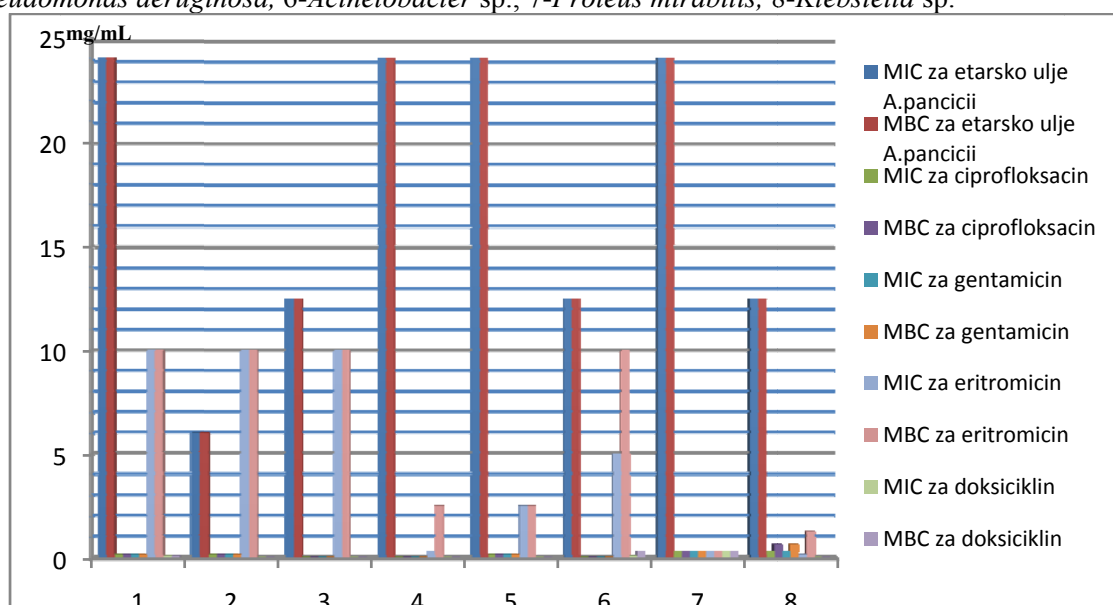


График 5-13. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Angelica panceicii* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолваних из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспирата: 8-*Escherichia coli*

У групи изолата из рана етарско уље *A. sylvestris* је било активно у нешто нижим концентрацијама у односу на уље *A. panceicii*. Међутим, ово уље је било знатно активније против изолата из брисева грла, спутума и аспирата, са изузетком соја *S. pyogenes*.

Високи антимикробни потенцијал ових етарских уља се може приписати доминантним компонентама присутним у овим уљима, као и синергистичким ефектима измеђи њих и великог броја компоненти заступљених у мањем проценту. Доминатне компоненте у етарским уљима *A. sylvestris* (лимонен 75,3% и α -пинен 9,6%) и *A. panicicii* (β -феландрен 54,9%, α -пинен 14,5% и α -феландрен 4,5%) су у ранијим радовима идентификоване као потенцијални антимикробни агенси. Већина горе наведених компоненти су биле присутне у етарском уљу корена *A. archangelica* (α -пинен 21,3%, лимонен 16,4% и α -феландрен 8,7%) које је показало добру антимикробну активност са вредностима MIC-а у опсегу од 0,25-2,25% против 5 бактеријских сојева (Fraternale и сар., 2014). Главни састојак у етарском уљу биљне врсте *A. glauca* био је α -феландрен (18,0%). Ово уље је показало антимикробну активност против осам тестираних сојева, а нарочито против сојева *E. coli* и *S. aureus*. MIC вредности су биле од опсегу од 141,3 до 159,3 $\mu\text{g/mL}$ (Irshad и сар., 2011). У етарском уљу изолованом из биљне врсте *Pinus patula* доминатне компоненте су биле β -феландрен (18,98%), α -пинен (15,91%), β -кариофилен (7,41%) и лимонен (5,67%), и оно је такође било ефикасно против *S. pyogenis*, *P. solanacearum* и *S. aureus* (Tomani и сар., 2014). Лимонен, који је главна компонента уља код *A. sylvestris*, је добро познат по својим антимикробним својствима (Magwa и сар., 2006). Он може бити ефикасан у очувању прехранбених производа од кварења (Espina и сар., 2013). Осим тога, он се је показао као високо ефикасан против сојева *S. typhi* и *S. aureus* у опсегу концентрација од 0,5 до 2,0 mg/mL (Vimal и сар., 2013) те може наћи примену и у лечењу бактеријских инфекција код људи. Такође, два уобичајена састојка етарских уља, лимонен и 1,8-цинеол, делујући појединачно или удружено у различитим односима, испољила су значајну активност против сојева *S. aureus* и *P. aeruginosa* (van Vuuren, Viljoen, 2007). Лимонен је био заступљен у високом проценту у *Citrus* врстама (*C. aurantium* - 59,7% и *C. limon* - 90,0%) и као чиста компонента је имао мало слабију активност (MIC=7-15 $\mu\text{g/mL}$) од чистог етарског уља цитруса (MIC=7-10 $\mu\text{g/mL}$) против 10 бактеријских сојева (Соковић и сар., 2010). Такође, етарско уље *Citrus sinensis*, које је у високом проценту садржало лимонен, испољило је антимикробно деловање против 8 бактеријских сојева (Obidi и сар., 2013). Лимонен и α -пинен су показали антимикробну активност са MIC вредностима у опсегу од 62,5-125 $\mu\text{g/mL}$ против сојева *P. aeruginosa*, *E. coli* и *S. aureus* (Dai и сар., 2013). Доминатне компоненте у етарском уљу *A. panicicii* (α -феландрен, β -феландрен и α -пинен), такође су биле заступљене и у етарском уљу биљне врсте *Monticalia*

imbricatifolia (33,89%, 19,28% и 16,81%,) са вредностима за MIC од 20-60 µg/mL против сојева *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* и *P. aeruginosa* (Buitrago и сар., 2012).

Етарско уље биљне врсте *Artemisia absinthium* је испољило веома изражену антибактеријску активност са инхибиторним и бактерицидним концентрацијама у опсегу од 4,72 до 37,80 mg/mL (**tabela 5-13**). Најизраженије је деловало против соја *P. aeruginosa* (1) изолованог из спутума (MIC=MBC=4,72 mg/mL), а најслабије против сојева *S. pyogenes*, *E. faecalis* и *E. coli* изолованих из брисева рана, *S. pneumoniae* из бриса носа и *S. pyogenes* из бриса грла (MIC=MBC=37,80 mg/mL). У поређењу са деловањем овог етарског уља, антибиотици су показали боље антибактеријско деловање, при чему је еритромицин деловао у опсегу од 2,5 до 10 mg/mL, а за доксициклин од 0,005 до 0,63 mg/mL. Резултати деловања етарског уља у односу на антибиотик су приказани на **графицима 5-14 и 5-15**.

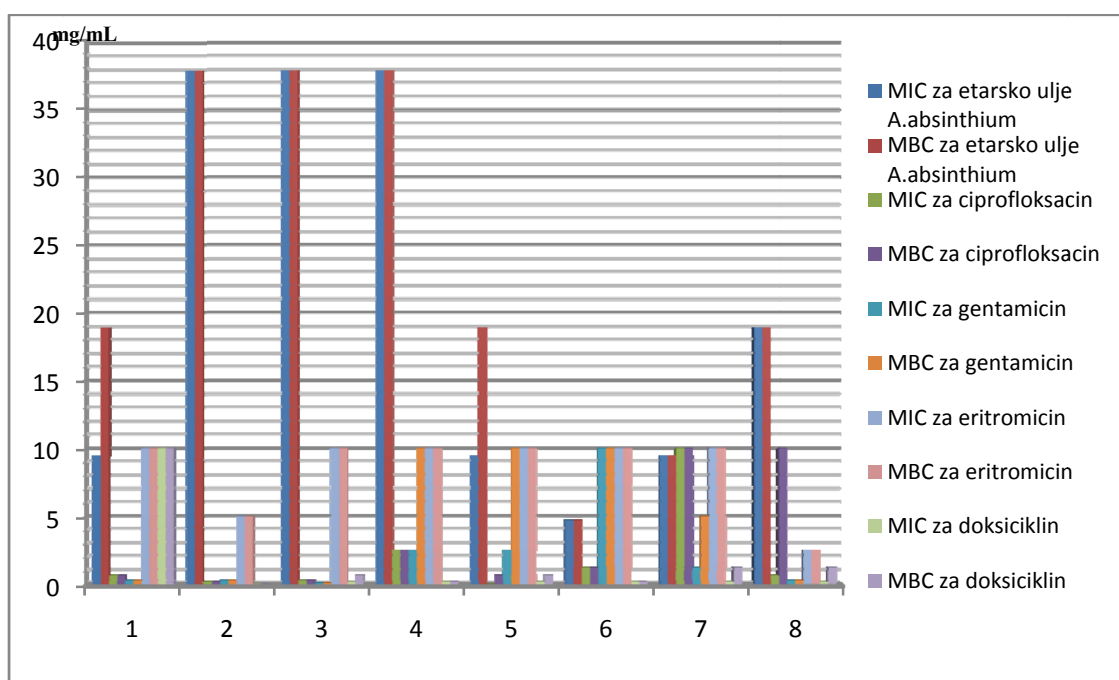


График 5-14. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Artemisia absinthium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp.

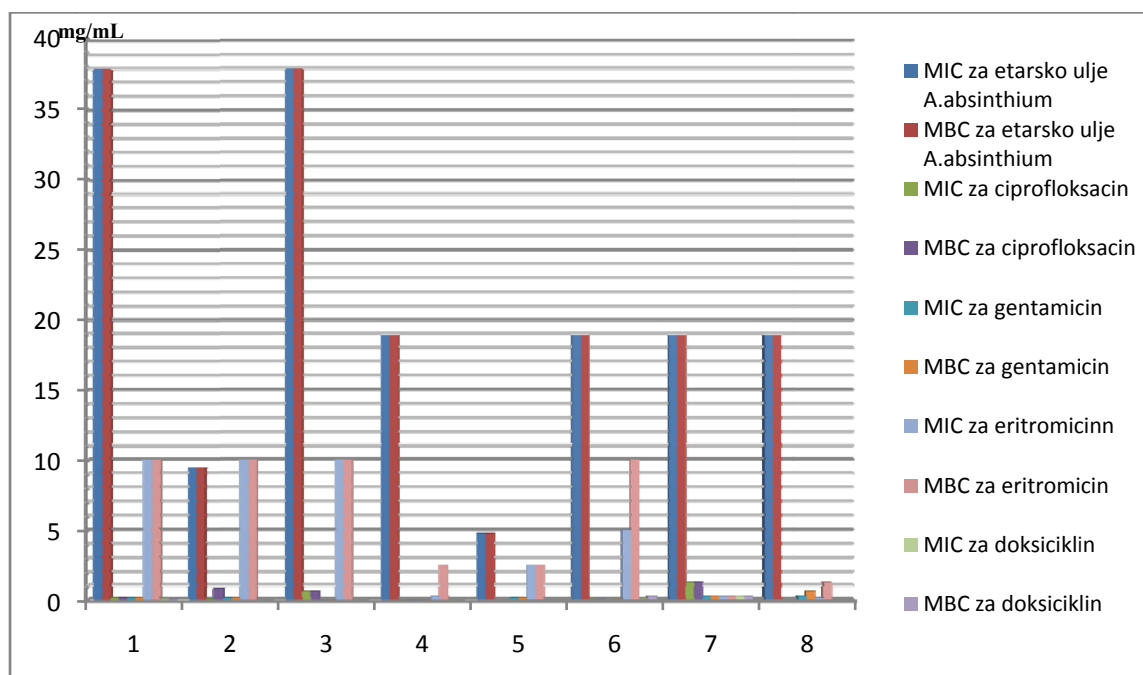


График 5-15. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Artemisia absinthium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспирата: 8-*Escherichia coli*

Активност уља ове биљне врсте је присутна и зависна од компоненти као што су сабинен (Баукап Егел и сар., 2012; Михајилов-Крстев и сар., 2014) и β -тујон (Благојевић и сар., 2006). С обзиром да је сабинен први бициклични интермедијер у настанку епимерних тујона (Баукап Егел и сар., 2012), може се претпоставити да је он, као доминатна компонента нашег узорка етарског уља *A. absinthium*, у највећој мери одговоран за његово антимикурно деловање. Сличну активност показало је и етарско уље пелина дестиловано из узорака са два локалитета у Србији (Мокра и обала Нишаве) (Благојевић и сар., 2006). Уља из узорака са оба локалитета су испитивана диск дифузионим методом и испољила су изражен инхибиторни ефекат против тестираних сојева *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans* и *A. niger*. Уље узорка прикупљеног са обале Нишаве показало незнатно јачу активност против свих испитиваних сојева, осим у случају *E. coli* и *S. aureus*. С обзиром да су тујони препознати као најодговорније активне супстанце у уљу пелина које утичу на раст и развој микоорганизама (Juteau и сар., 2003), може се претпоставити да је горе поменута разлика у активности настала као последица посебно високог садржаја β -тујона у уљу *A. absinthium* са обале Нишаве (64,4%) у поређењу са уљем из Мокре (19,8%). Антимикробна активност етарског уља *A.*

absinthium пореклом из Француске (доминантне компоненте (3)-епоксиоцимен и хризантенил ацетат) је била знатно нижа у односу на уље пореклом из Хрватске (доминантне компоненте (3)-епоксиоцимен и β -тујон). Претпоставља се да је управо недостатак тујона у првом узорку уља разлог његовог слабог инхибиторног деловања против сојева *C. albicans* и *S. cerevisiae* var. *chevalieri*, као и потпуног изостанка антибактеријског деловања против сојева *E. coli*, *S. aureus* и *Enterococcus hirae* (Juteau и сар., 2003).

Етарско уље *Achillea crithmifolia* је деловало инхибиторно и бактерицидно у опсегу концентрација од 5,36 - 85,80 mg/mL (**tabela 5-13**). Најизраженије је деловало против соја *S. pyogenes* из бриса ране и бриса грла (MIC=MBC=5,36 mg/mL), док је најслабије деловало против соја *P. mirabilis* из бриса ране (MIC/MBC=42,90/85,80 mg/mL). Уље ове биљне врсте је имало изражену ефикасност против сојева *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* (Палић и сар., 2003). Сви тестирани антибиотици су показали боље антибактеријско деловање од испитиваног уља, осим код соја *S. pneumoniae* из бриса носа и *Streptococcus pyogenes* из бриса грла, код којих је еритромицин деловао слабије. Резултати деловања етарског уља у односу на антибиотик су приказани на **графикима 5-16 и 5-17**.

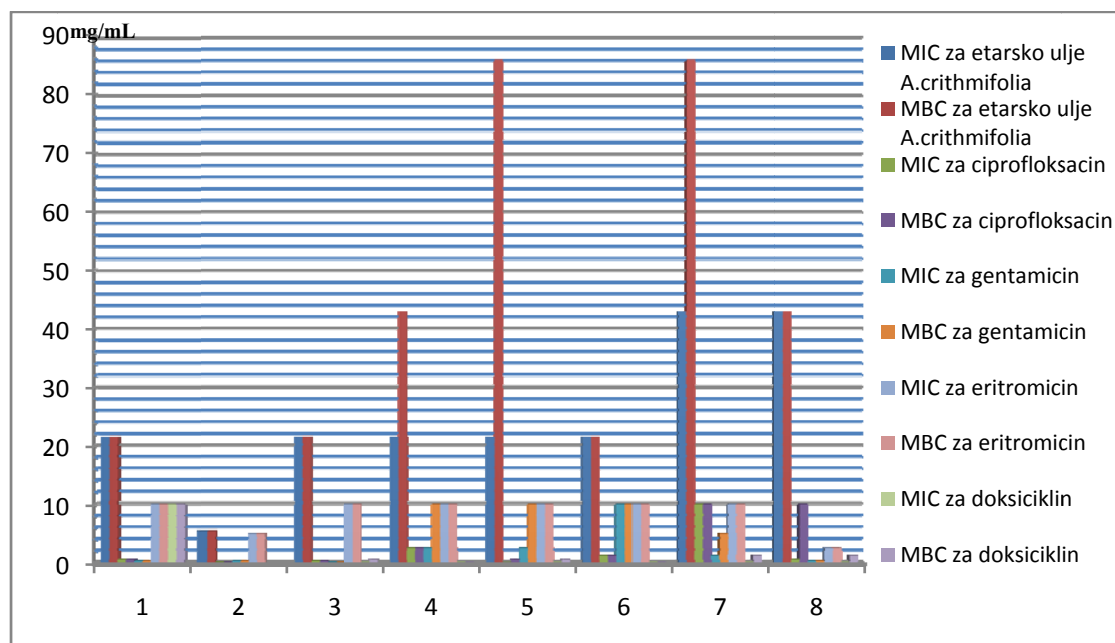


График 5-16. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Achillea crithmifolia* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp.

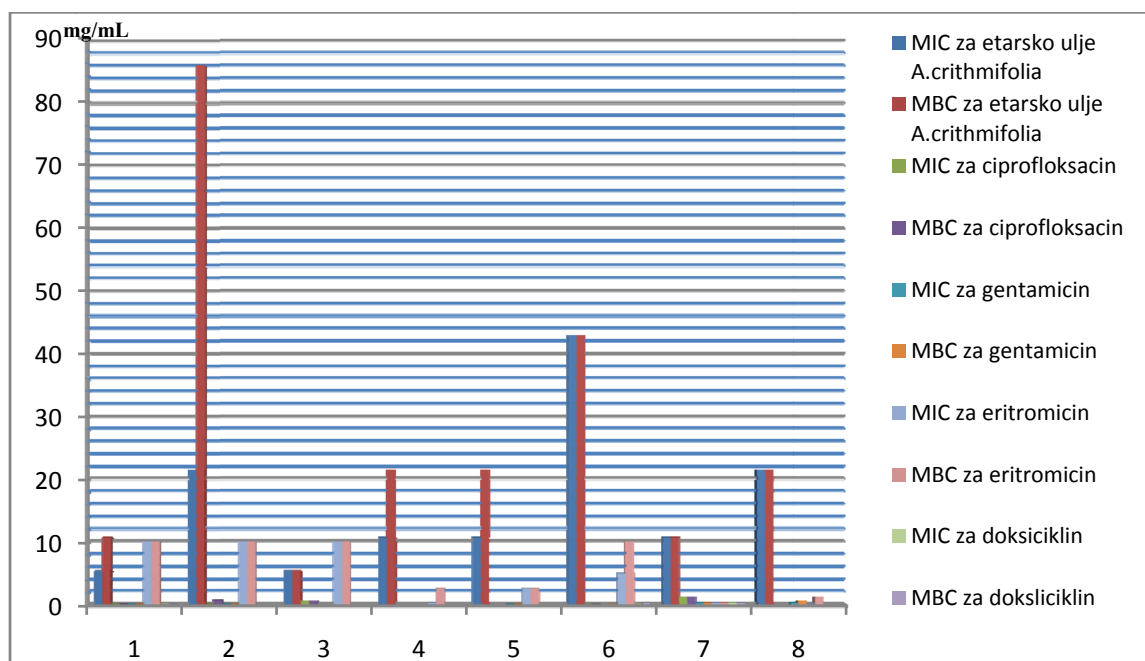


График 5-17. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Achillea crithmifolia* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella sp.* и аспирата: 8-*Escherichia coli*

Поред заједничких компоненти присутних у оба узорка, монотерпена камфора и 1,8-цинеола, у нашем испитиваном узорку је са највећим уделом био присутан и монотерпен артемизија кетон. У ранијим истраживањима је потврђено веома снажно антимикуробно и антирадикалско деловање артемизија кетона у поређењу са другим монотерпенима присутним у биљној врсти *Artemisia annua*. Појединачно и синергистичко деловање артемизија кетона са другим идентификованим монотерпенима објашњава и јаку антибактеријску активност етарског уља *A. crithmifolia* са простора на територији Србије (Радуловић и сар., 2013).

Етарско уље биљне врсте *Achillea grandifolia* је деловало инхибиторно и бактерицидно против свих тестираних сојева у опсегу концентрација од 5,77 - 46,15 mg/mL (табела 5-13). Најјаче је деловало против соја *E. faecalis* из бриса ране (MIC=MBC=5,77 mg/mL), а најслабије против сојева *P. mirabilis* и *Klebsiella sp.* такође из брисева рана, *E. coli* из бриса грла и *P. aeruginosa* (2) из спутума (MIC=MBC=46,15 mg/mL). Референтни антибиотици су деловали боље од испитиваног етарског уља, осим према соју *E. faecalis* из бриса ране, где је еритромицин показао слабије инхибиторно и бактерицидно деловање. Резултати деловања етарског уља у односу на антибиотик су приказани на графицима 5-18 и 5-19.

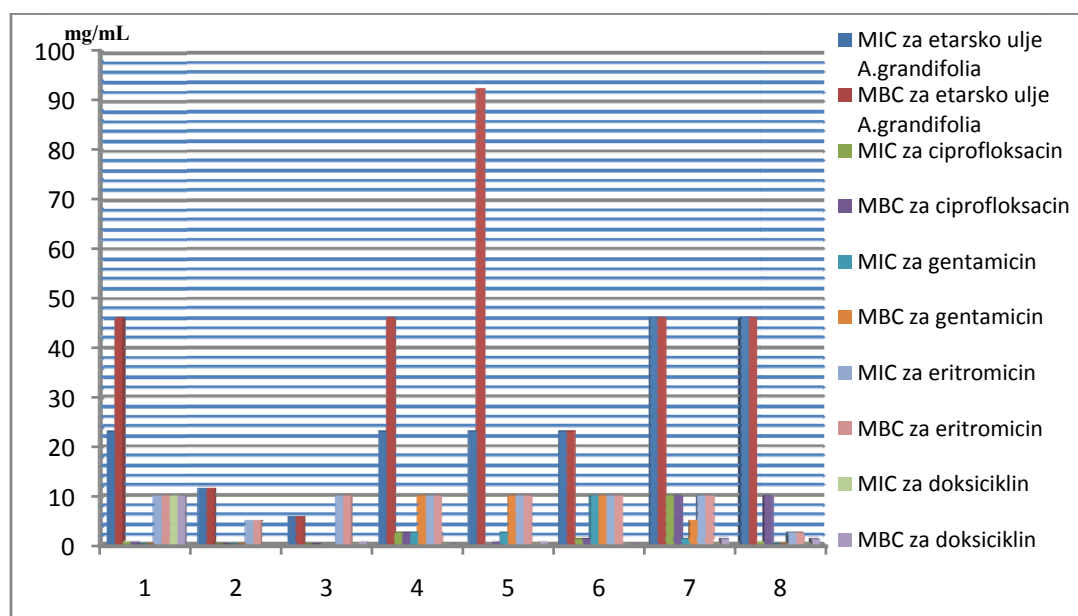


График 5-18. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Achillea grandifolia* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp.

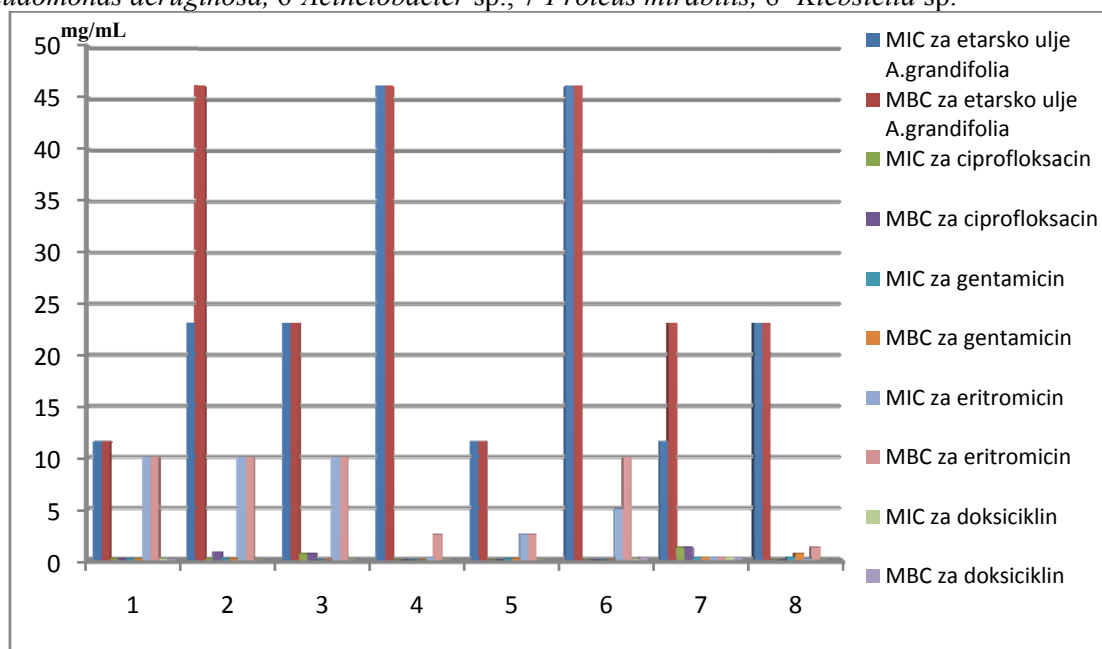


График 5-19. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Achillea grandifolia* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспиригата: 8-*Escherichia coli*

Прегледом доступне литературе је установљено да су ово први презентовани подаци о антибактеријском деловању етарског уља биљне врсте *A. grandifolia*

(Станковић и сар., 2016). С обзиром да су главне компоненте у узорку уља биле камфор (45,4%), 1,8-цинеол (16,4%) и α -тујон (15,1%), који поседују доказано антимикробно и токсично деловање, претпостављамо да су оне носиоци антимикробне активности етарског уља *A. grandifolia*.

Етарско уље биљне врсте *Tanacetum parthenium* је деловало против свих тестираних сојева инхибиторно и бактерицидно у опсегу концентрација од 11,65 – 93,20 mg/mL (табела 5-13). Најизраженије је деловало против сојева *S. pneumoniae* из бриса носа (MIC=MBC=11,65 mg/mL) и *Klebsiella* sp. из спутума (MIC/MBC=11,65/23,3 mg/mL). Према свим тестираним бактеријским сојевима су испитивани антибиотици показали снажније деловање. Резултати деловања етарског уља у односу на антибиотике су приказани на графицима 5-20 и 5-21.

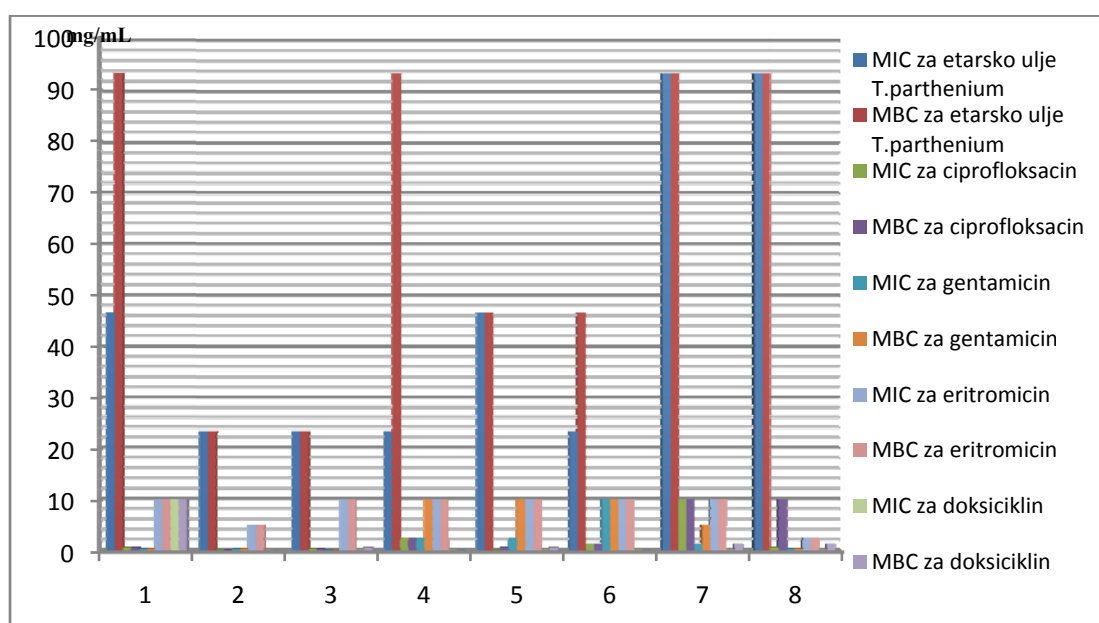


График 5-20. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Tanacetum parthenium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp.

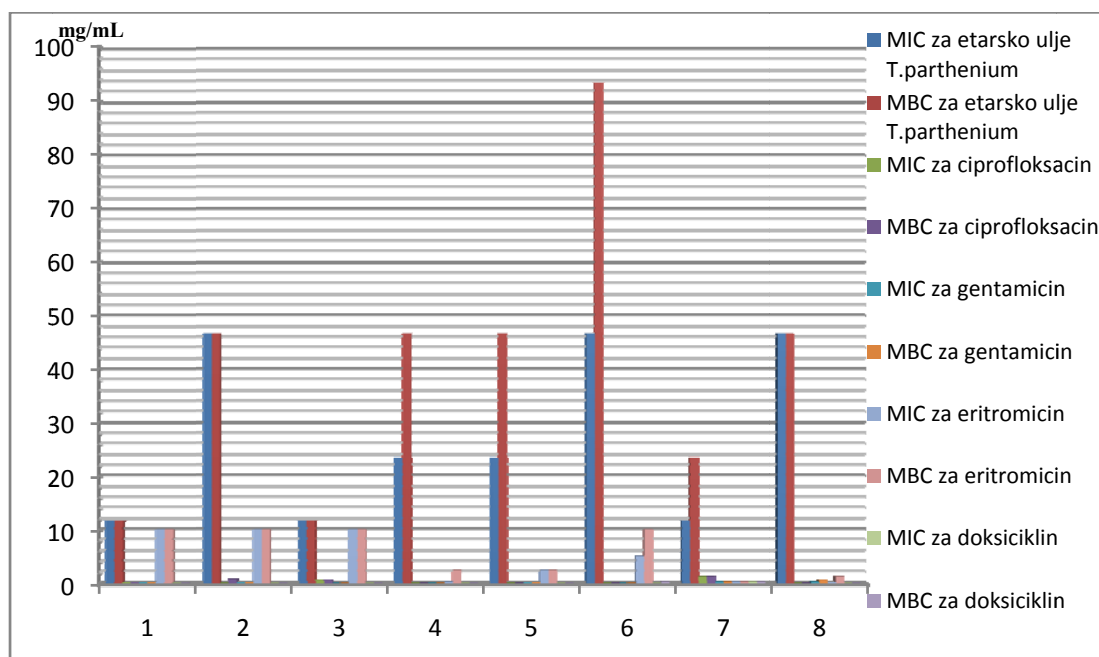


График 5-21. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Tanacetum parthenium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella sp.* и аспирата: 8-*Escherichia coli*

Polatoglu и сар. (2010) су тестирали активност уља ове биљне врсте против 5 Грам (+) и 5 Грам (-) сојева уз помоћ микродилуционе методе. Најјача активност је детектована против сојева *B. subtilis*, *S. aureus* и метицилин резистентног соја *S. aureus*, а у поређењу са референтним антибиотцима уља су имала веће MIC вредности (Polatoglu и сар., 2010). Izadi и сар. (2010) су испитивали антимикуробну активност етарског уља *T. parthenium* уз помоћ диск дифузионе методе против патогених сојева *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *E. coli* и *P. aeruginosa*. Резултати су показали значајну разлику у осетљивости између Грам (+) и Грам (-) бактерија, при чему су Грам (+) бактерије (*B. cereus* и *S. aureus*) биле много осетљивије на деловање уља (Izadi и сар., 2010). Исти аутори су, користећи диск дифузиону и микродилуциону методу, вршили испитивање активности овога уља против патогених бактеријских сојева *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* и *S. marcescens*. Просечан дијаметар зоне инхибиције за Грам (+) бактерије је био већи код уља него код антибиотика ванкомицина и амфотерицина Б, али је код Грам (-) бактерија био мањи у односу на гентамицин (Izadi и сар., 2013). Резултати ових испитивања указују на инхибиторну и гермицидну моћ етарског уља *T. parthenium*. Доминантне компоненте у уљу *T.*

parthenium су у свим објављеним радовима биле камфор, хризантенил ацетат и камфен, што је случај и са нашим испитиваним узорком. Узимајући у обзир да камфор, који има дезинфекциони ефекат (Keville, 1996; Chehregani и сар., 2009), чини више од 51% нашег узорка уља, може се претпоставити да је он одговоран за инхибиторни и летални ефекат етарског уља ове биљне врсте. Међутим, не би требало занемаривати и синергистичке интеракције са другим компонентама због тога што су етарска уља сложене смеше великог броја различитих једињења. Истраживања показују да антимикробна својства етарских уља биљака као што су *Salvia officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., расту услед синергистичког деловања доминантних и минорних компоненти (Burt S, 2004).

Етарско уље *Hyssopus officinalis* је деловало инхибиторно и бактерицидно против свих тестираних микроорганизама у опсегу концентрација од 11,08 – 88,60 mg/mL (табела 5-12). Најјаче је деловало против соја *P. aeruginosa* (1) изолованог из спутума (MIC=MBC=11,08 mg/mL), а најслабије против сојева *S. pyogenes* и *Klebsiella* sp. изолованих из брисева рана (MIC=MBC=88,60 mg/mL). Референтни антибиотици су показали израженије инхибиторно и бактерицидно деловање према свим тестираним сојевима у односу на етарско уље. Резултати деловања етарског уља у односу на антибиотике су приказани на графицима 5-22 и 5-23.

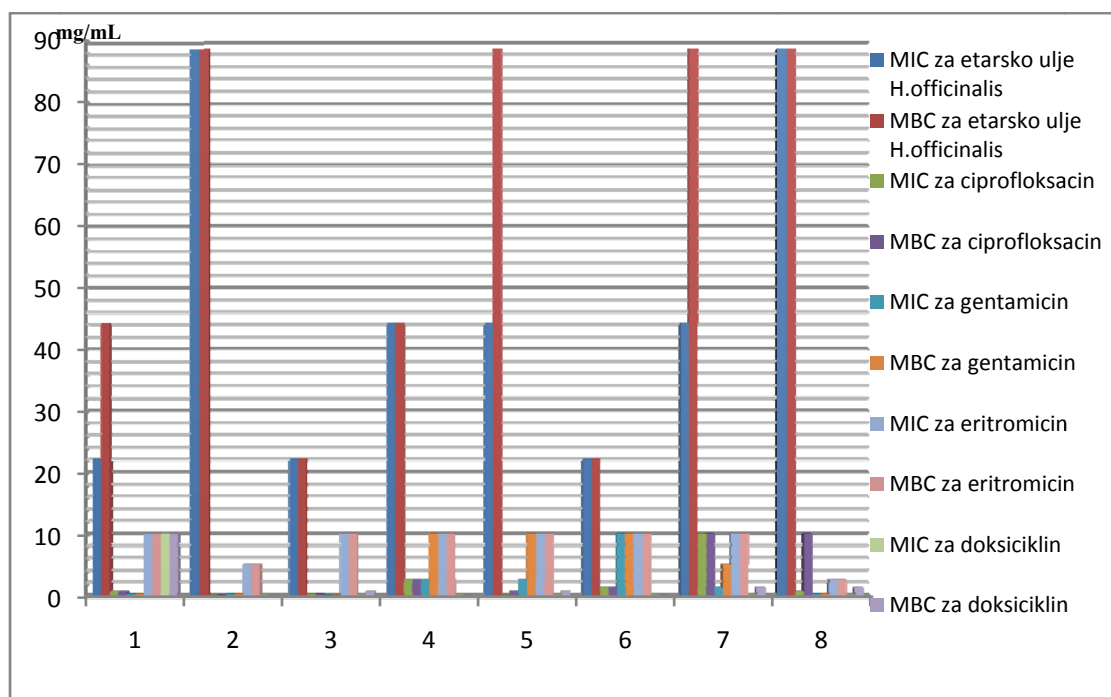


График 5-22. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Hyssopus officinalis* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8- *Klebsiella* sp.

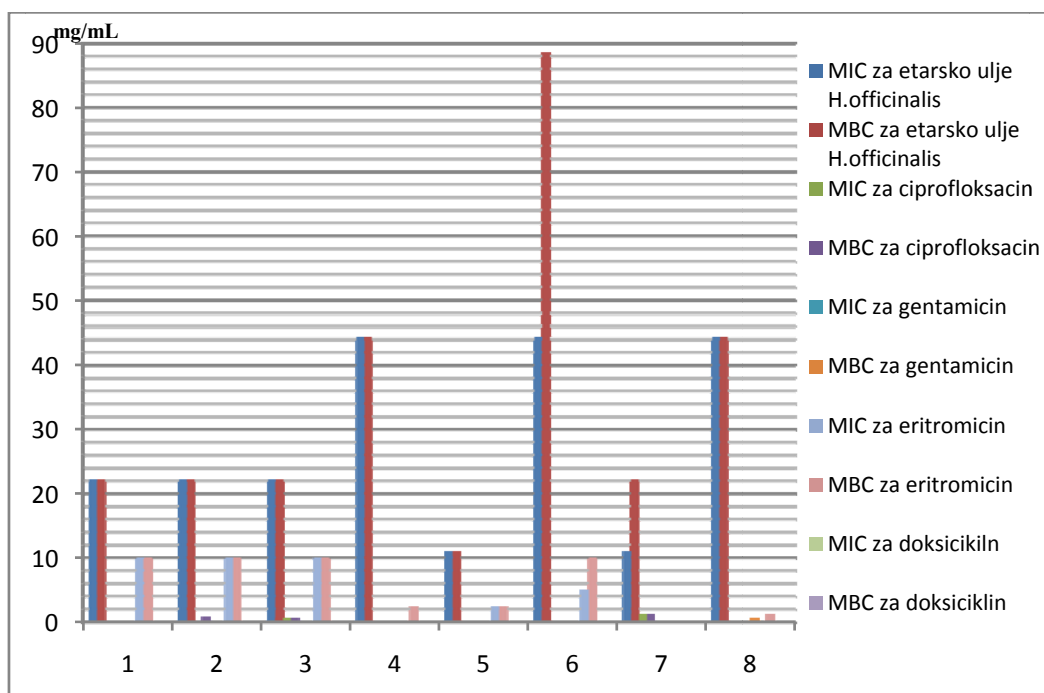


График 5-23. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Hyssopus officinalis* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолованих из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспирата: 8-*Escherichia coli*

На основу литратурних података се може закључити да се антимикурно деловање уља ове врсте разликује између различитих хемотипова. Хемотип популација са локалитета у Ирану који је садржао камфор (10,3%–53,3%) и хризантенил ацетат (4,3%–22,5%) је антибактеријски деловао слабо или уопште није деловао (Dehghanzadeh и сар., 2012). Други хемотип популација са локалитета у Турској, Италији и Ирану који је садржао изопинокамфопинон (39,3%), пинокамфон (44,4%) и изопинокамфон (57,27; 22,1 и 43,4%) је показао значајну антибактеријску активност (Kizil и сар., 2010; Mazzanti и сар., 1998; Mahboubi и сар., 2011). Трећи хемотип популација са локалитета у Француској и Италији (*H. officinalis* var. *decumbens*), је садржао у највећем проценту линалол (51,7%) и имао је бољу активност од остала два хемотипа (Mazzanti и сар., 1998). Kizil и сар. (2010) су у испитивању антимикурног деловања уља *H. officinalis* користили диск дифузиони метод са по 5 и 10 μL уља против сојева *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes* и *C. albicans*. Утврдили су јако антимикурно деловање против сојева *S. pyogenes*, *S. aureus*, *C. albicans* и *E. coli*, али није детектовано никакво деловање против соја *P. aeruginosa* (Kizil и сар., 2010). Mazzanti и сар. (1998) су испитивали антимикурно деловање етарских уља *H.*

officinalis и *H. officinalis* var. *decumbens* микродилуционом и диск дифузионом методом против бактеријских сојева *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *K. oxytoca*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Pseudomonas* spp., и два соја *Salmonella* spp., као и против седам сојева *Candida albicans*, *C. krusei* и *C. tropicalis*. Етарско уље *H. officinalis* је показало занемарљиво антимикробно деловање код свих сојева, док је var. *decumbens* деловао само у пар случајева (*Enterococcus* spp., *E. coli*). Оба испитивана уља су показала јако инхибиторно деловање против свих сојева рода *Candida*. У течном медијуму МИС испитиваног уља *H. officinalis* је био >1,2% v/v, док се код уља *H. officinalis* var. *decumbens* кретао између 0,15 - 0,6% за Грам (+) бактерије и 0,3 - 1,2% за Грам (-) бактерије. Сматра се да линалол и 1,8-цинеол, могу да допринесу већој антимикробној активности *H. officinalis* var. *decumbens* код бактерија, док је лимонен заслужан за антимикотично деловање против сојева рода *Candida* у оба случаја (Mazzanti и сар., 1998). Коришћењем диск дифузионе и микродилуционе методе вршено је тестирање антимикробног деловања етарског уља *H. officinalis* против различитих микроорганизама. Уље је показало значајну антимикробну активност против Грам (+) бактерија са зоном инхибиције од 7 - 16 mm и минималним инхибиторним концентрацијама од 0,5–1 µL/mL. Ово уље је испољило инхибиторно деловање и против фунгалних сојева (Mahboubi и сар., 2011). Dehghanzadeh и сар. (2012) су истраживали антимикробно деловање етарског уља *H. officinalis* против следећих микроорганизама (*S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* sp., *B. subtilis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Acidovorax* sp., *Erwinia amylovora*, *Streptomyces scabies*, *P. fluorescens*), користећи микродилуциону и диск дифузиону методу. Уље је показало јако антибактеријско деловање против *Erwinia amylovora* и *Klebsiella* sp., док против осталих патогена није деловало (Dehghanzadeh и сар., 2012). У свим цитираним радовима доминантне компоненте уља *H. officinalis* су биле изопинокафон, пинокамфон, линалол, 1,8-цинеол, лимонен, β-пинен, што је у сагласности са нашим резултатима (1,8-цинеол 49,1%, изопинокафон 22,69% и β-пинен 11,3%).

Инхибиторно и бактерицидно деловање етарског уља *Laserpitium latifolium* кретало се у опсегу концентрација од 10,52 до 84,20 mg/mL (табела 5-12). Најјаче антибактеријско деловање је показало против соја *Klebsiella* sp. из спутума и соја *Acinetobacter* sp. из бриса ране (MIC/MBC=10,52/21,05 mg/mL), као и против једног од сојева *P. aeruginosa* из спутума (MIC/MBC=10,52/42,1 mg/mL). Испитивани референтни сојеви су деловали израженије на све бактеријске сојеве у поређењу са

испитиваним етарским уљем. Резултати деловања етарског уља у односу на антибиотик су приказани на **графикима 5-24 и 5-25**.

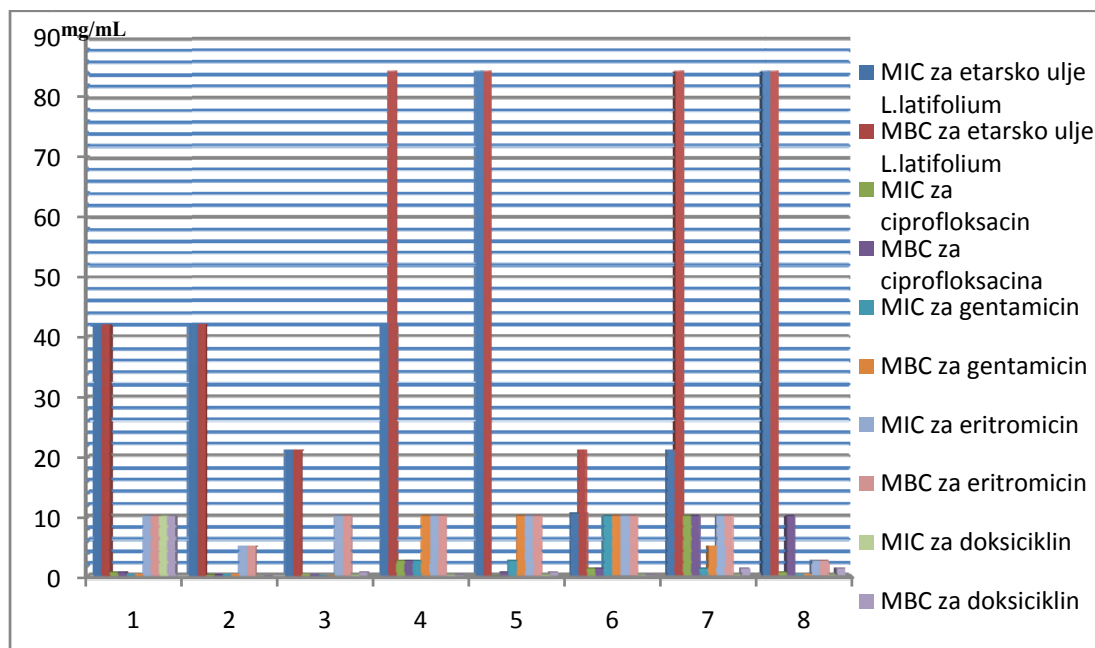


График 5-24. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Laserpitium latifolium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолваних из брисева рана: 1-*Staphylococcus aureus*, 2-*Streptococcus pyogenes*, 3-*Enterococcus faecalis*, 4-*Escherichia coli*, 5-*Pseudomonas aeruginosa*, 6-*Acinetobacter* sp., 7-*Proteus mirabilis*, 8-*Klebsiella* sp.

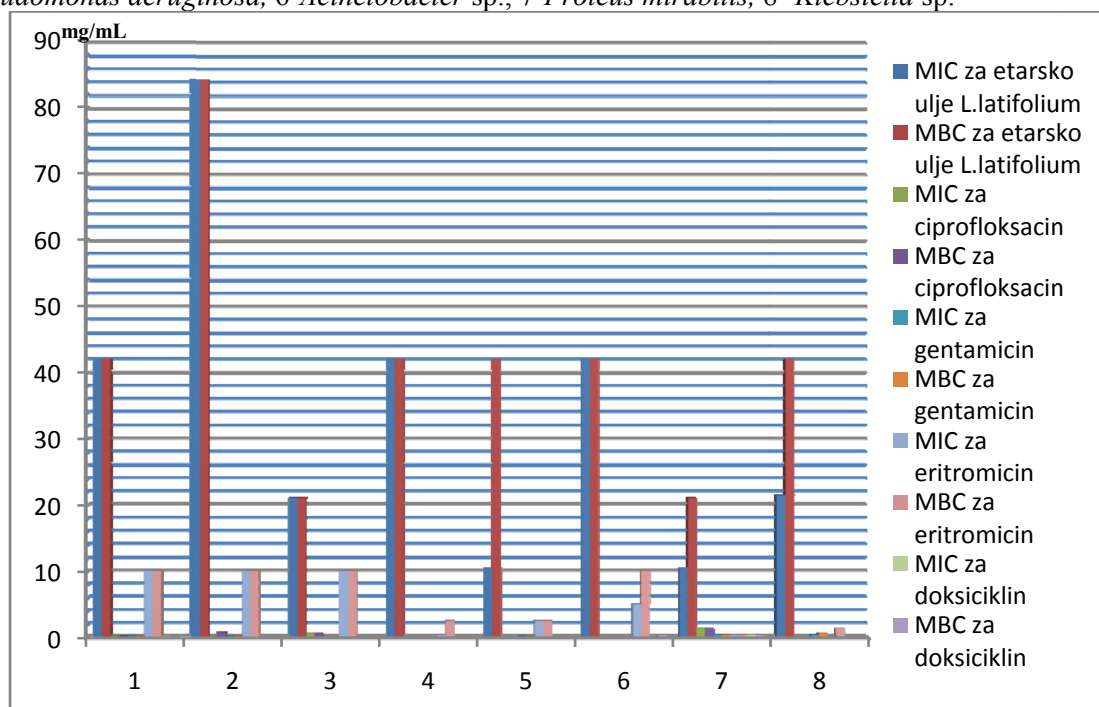


График 5-25. Антибактеријска активност етарског уља биљне врсте *Laserpitium latifolium* и референтних антибиотика против бактеријских сојева изолваних из брисева носа: 1-*Streptococcus pneumoniae*, 2-*Staphylococcus aureus*; брисева грла: 3-*Streptococcus pyogenes*, 4-*Escherichia coli*; спутума: 5-*Pseudomonas aeruginosa* (1), 6-*Pseudomonas aeruginosa* (2), 7-*Klebsiella* sp. и аспиригата: 8-*Escherichia coli*

У једином доступном раду, Поповић и сар. (2015) су приказали резултате добијене испитивањем антимикробне активности уља биљних врста *L. latifolium* и *L. ochridanum* против сојева *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *E. coli* и два соја *C. albicans* уз помоћ микродилуционе методе. Етарско уље подземних органа *L. ochridanum*, као и уља плодова обе врсте рода *Laserpitium* показала су активност против сојева *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* (MIC 13,03-73,00 µg/mL). Етарско уље подземних органа *L. latifolium* је имало слабу антибактеријску и антифунгалну активност пошто су вредности MIC-а биле преко 100 µg/mL. С обзиром да оба испитивана уља садрже висок удео α – пинена, а само је уље добијено из плодова богато и сабиненом, могуће је да је синергистичко деловање обеју компоненти одговорно за бољу активност уља добијеног из плодова (Поповић и сар., 2010). На исти начин се може објаснити и добра антимикробна активност уља добијеног из нашег узорка надземних делова *L. latifolium* (сабинен 47,8 и α - пинен 25,0%) (Станковић и сар., 2016).

Поређењем добијених резултата може се истаћи да су испитивана етарска уља имала опадајућу антимикробну активност следећим редом: *Angelica sylvestris* > *Angelica panicii* > *Achillea crithmifolia* > *Artemisia absinthium* > *Achillea grandifolia* > *Laserpitium latifolium* > *Hyssopus officinalis* > *Tanacetum parthenium*.

Најбољи резултати су забележени код деловања уља *A. crithmifolia* против сојева *S. pneumoniae* из бриса грла (MIC/MBC=5,36/10,72 mg/mL) и *S. pyogenes* из бриса носа (MIC/MBC=5,36/5,36 mg/mL), затим код деловања уља *A. grandifolia* против *E. faecalis* из бриса рана (MIC=MBC=5,77 mg/mL) и уља *A. absinthium* против *Acinetobacter* sp. из бриса рана (MIC/MBC=4,72/4,72 mg/mL), *P. aeruginosa* (1) из спутума (MIC/MBC=4,72/4,72 mg/mL) и *S. aureus* из бриса рана (MIC/MBC=9,45/9,45 mg/mL).

На деловање свих уља генерално најрезистентнији су били сојеви *Klebsiella* sp., *P. mirabilis* и *E. coli* (из бриса рана) и *P. aeruginosa* (2) (из спутума). Такође, може се запазити да су уља против већине сојева деловала веома слично, у опсегу концентрација од 21,45 – 46,60 mg/mL.

За антимикробну активност испитиваних уља су у већини случајева одговорне њихове доминантне компоненте са познатим антимикробним деловањем. Осим тога, богатство уља тј. велики број различитих компоненти присутних у уљима, такође играју улогу у дефинисању њихових липофилних и хидрофилних својстава,

могућности везивања за бактеријски ћелијски зид, трансферу кроз ћелијске мембране и доброј расподели у ћелији (Cal, 2006; Bakkali и сар., 2008).

Доминантне компоненте испитиваних уља су биле: лимонен (уље врсте *A. sylvestris*), камфор (уља врста *T. parthenium*, *A. grandifolia* и *A. crithmifolia*), 1,8 - цинеол (уља врста *H. officinalis*, *A. grandifolia* и *A. crithmifolia*), сабинен (уља врста *L. latifolium* и *A. absinthium*), α -пинен (уље врсте *L. Latifolium*), α -тујон (уље врсте *A. grandifolia*). Од осталих компоненти забележен је висок удео артемизија кетона (уље врсте *A. crithmifolia*), β -феландрена (уље врсте *A. pancicii*), транс-хризантенилацетата (уље врсте *T. parthenium*), изопинокамфона (уље врсте *H. officinalis*) и орто-цимена и (3)-епокси-оцимена (уље врсте *A. absinthium*).

Доминантне компоненте најактивнијих уља биљних врста *A. sylvestris* и *A. pancicii*, лимонен, α -пинен, β -феландрен и α -феландрен су познати антимикуробни агенси о чему је детаљно дискутовано раније (Magwa и сар., 2006; van Vuuren, Viljoen, 2007; Соковић и сар., 2010; Irshad и сар., 2011; Buitrago и сар., 2012; Fraternali и сар., 2013; Espina и сар., 2013; Vimal и сар., 2013; Obidi и сар., 2013; Dai и сар., 2013).

Такође, у ранијим радовима је доказано и антимикуробно деловање камфора и 1,8-цинеола (Izadi и сар., 2010). Међутим, иако је од свих испитиваних уља, уље врсте *T. parthenium* имало највећи садржај камфора и 1,8-цинеола, за које се претпоставља да су основни антимикуробни агенси ове врсте (Keville, 1996; Haider, 2007), оно је деловало најслабије у односу на остала испитивана уља. Антимикуробни допринос друге значајније компоненте уља *H. officinalis*, изопинокамфона, је мали с обзиром да је из литературе познато да уље ове врсте која у високом проценту садржи изопинокамфон (43,3%) има доста нижу антимикуробну активност у односу на уље варијетета *H. officinalis* var. *decumbens* код кога доминира линалол (51,7 %) (Mazzanti и сар., 1998). Осим тога, уље *A. grandifolia* такође садржи доста камфора и 1,8-цинеола али се његова боља активност вероватно базира на присуству антимикуробног једињења α -тујона (Juteau и сар., 2003). И најзад, најефикасније је било уље друге врсте истог рода *A. crithmifolia* које у односу на претходне три врсте садржи најмање камфора и 1,8-цинеола али у високом проценту има артемизија кетон за кога је раније утврђено снажно антимикуробно деловање (Радуловић и сар., 2013).

Од уља богатих сабинином, уље *A. absinthium* је деловало знатно боље у односу на уље *L. latifolium*. Иако прво уље садржи мање сабинена и неупоредиво мање α -пинена, његов квалитативни састав је богатији (53 компоненте) у односу на уље *L.*

latifolium (свега 26 компоненти). Може се претпоставити да, поред тога што су сабинен (Baykan Erel et al., 2012) и α -пинен (Burt, 2004) могући антимикробни агенси, синергистичко деловање осталих многобројних компоненти вероватно доприноси бољој антимикробној активности (Burt, 2004; Cal, 2006).

5.1.4. Синергистичко деловање етарског уља *A. sylvestris* и *A. panicii* са антибиотиком еритромицином

Појава синергизма код етарских уља може бити сагледана са више аспеката. Најчешће је проучавано синергистичко деловање доминатних и минорних компоненти појединачних уља (Bassolé и Juliani, 2012), затим синергистичко деловање два или више етарских уља или њихових доминатних компоненти (Gutierrez и сар., 2009) и синергистичко деловање два или више етарских уља са антибиотцима (Vegas и сар., 2012). Могуће су и друге комбинације, на пример са природним конзервансима.

Антимикробна активност етарског уља, може се потпуно разликовати од активности његових појединачних компоненти (Delaquis и сар., 2002). Етарско уље листа *Heteropuxis dehniae* које је садржало линалол у високој концентрацији (58,3%), показало је различиту активност у односу на чист линалол зависно од врсте тестираног микроорганизма (Sibanda и сар., 2004). Доказано је да бактерија *E. coli* која је јако осетљива на чист линалол, постаје веома резистентна на смешу линалола и 1,8-цинеола (Faleiro и сар., 2003). Приликом испитивања антимикробне активности линалола, карвакрола, перилалдехида и 1,8-цинеола према микроорганизмима из ваздуха, забележена је изразита антимикробна активност линалола који је смањио њихов број за 29,7% (Krist и сар., 2008). Етарска уља каранфилића, лаванде и гераниума су испољила снажно антибактеријско деловање против веома резистентног соја *P. aeruginosa* и могу имати потенцијалну примену у борби са једном од најрезистентнијих Грам (-) бактерија (Mahboobi и сар., 2006). С друге стране, испитивања других аутора су указала на снажно антимикробно дејство линалола, али и на његов слаб ефекат против *P. aeruginosa* (Matasyoha и сар., 2007). На основу представљених података можемо закључити да доминатне компоненте у етарским уљима веома много утичу на њихове антимикробне способности и биолошке активности (Ipek и сар., 2005). Такође, утврђено је да инхибиторна активност етарских уља зависи од сложених интеракција међу његовим компонентама које могу имати адитиван, синергистички или антагонистички карактер (Xianfei и сар., 2007), као и да је концепт испитивања

антимикробног деловања етарских уља, као сложених смеша великог броја једињења, смисленији од проучавања деловања појединачних компоненти (Cal, 2006).

Интеракција етарских уља са антибиотцима је један од нових начина превазилажења проблема бактеријске резистенције. Познати су механизми антибактеријске интеракције као што су: инхибиција заштитних ензима, рекомбинација мембрански активних агенаса, секвенцијална инхибиција заједничких биохемијских путева и употреба мембранотропних агенаса који повећавају могућност дифузије за друга антимикробна средства (Sokolova и сар., 2005). Тимол и карвакрол из етарског уља *Origanum vulgare* изазвају физичке промене на ћелијској мембрани, мењајући њену пропустљивост; врше денатурацију есенцијалних ензима; мењају рН и електрични потенцијал у ћелији и на тај начин повећавају могућност за унос антибиотика (Helander и сар., 1998). Осим тога, они могу да мењају активност калцијумових канала и да узрокују истискивање неких важних јона из ћелије (Ouattara и сар., 1997). Показано је да су етарска уља *Zanthoxylum articulatum*, *Vanillosmopsis arborea*, *Lippia microphylla* и *Croton zehntneri* реаговала са аминогликозидима и хиналонским антибиотцима и повећајући њихову активност против *S. aureus* и *P. aeruginosa* (Rodrigues и сар., 2009,2010; Santos и сар., 2011; Coutinho и сар., 2010, 2011). Повећана резистентност према еритромицину је била разлог испитивања антимикробног и синергистичког деловања између њега и етарских уља *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *Mentha piperita* и *Melaleuca alternifolia* против 32 еритромицин-резистентна соја. Карвакрол који је доминантна компонента у мајчиној душици и оригану је показао најјизраженије деловање, како појединачно, тако и у синергизму са еритромицином против 21 од 32 испитивана соја (Magi и сар., 2015).

У овом раду су, на основу резултата добијених уз помоћ микродилуционе методе, одабрана најактивнија етарска уља биљних врста *A. sylvestris* и *A. panicii* и антибиотик са најслабијим деловањем, еритромицин. Њихово синергистичко деловање је испитивано у циљу побољшања деловања антибиотика у мањим терапијским дозама, уз помоћ методе шаховске табле (*Checkerboard* метода) против свих испитиваних бактеријских сојева. За одређивање типа интеракција између две одабране компоненте (појединих уља и еритромицина) израчунавана је фракциона инхибиторна концентрација (FIC), а добијене вредности тумачене на следећи начин: синергистички ($FIC < 0,90$), адитивни ($0,90 \leq FIC \leq 1,10$) и антагонистички ($FIC > 1,10$) ефекат. Резултати

испитивања синергистичког деловања етарских уља биљних врста *A. sylvestris* и *A. panicii* са еритромицином су приказани на **графицима 5-26** и **5-27**.

Комбинације етарског уља *A. sylvestris* и еритромицина су показале постојање синергизма према свим тестираним сојевима. FIC вредности су се кретале у распону од 0,56 (*P. mirabilis* из бриса ране) до 0,88 (*Acinetobacter* sp. из бриса ране). Вредности FIC код осталих сојева су биле следеће: 0,69 (*P. aeruginosa* 2 из спутума) 0,84 (*Klebsiella* sp. из бриса ране) и 0,87 (*P. aeruginosa* 1 из спутума). Све комбинације етарског уља *A. panicii* и еритромицина су, такође, показале синергистичко деловање према свим испитиваним сојевима. FIC вредности су биле следеће: 0,27 (*S. aureus* из бриса носа); 0,74 (*S. aureus* из бриса ране); 0,87 (*S. pyogenes* из бриса ране, *E. faecalis* из бриса ране, *Acinetobacter* sp. из бриса ране).

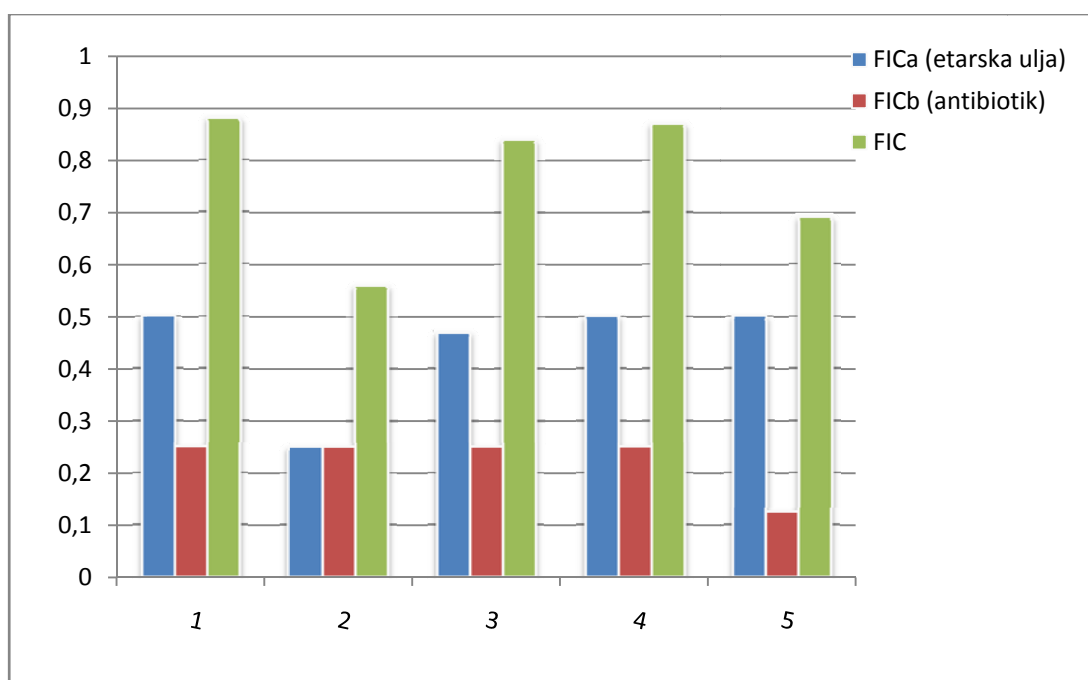


График 5-26. Синергистичко деловање етарског уља *A. sylvestris* са еритромицином у односу на изабране бактеријске сојеве.

(1) *Acinetobacter* sp. (брис ране); (2) *P. mirabilis* (брис ране); (3) *Klebsiella* sp. (брис ране); (4) *P. aeruginosa* 1 (спутум) и (5) *P. aeruginosa* 2 (спутим). FIC – фракциона инхибиторна концентрација. SD= $\pm 0,02$

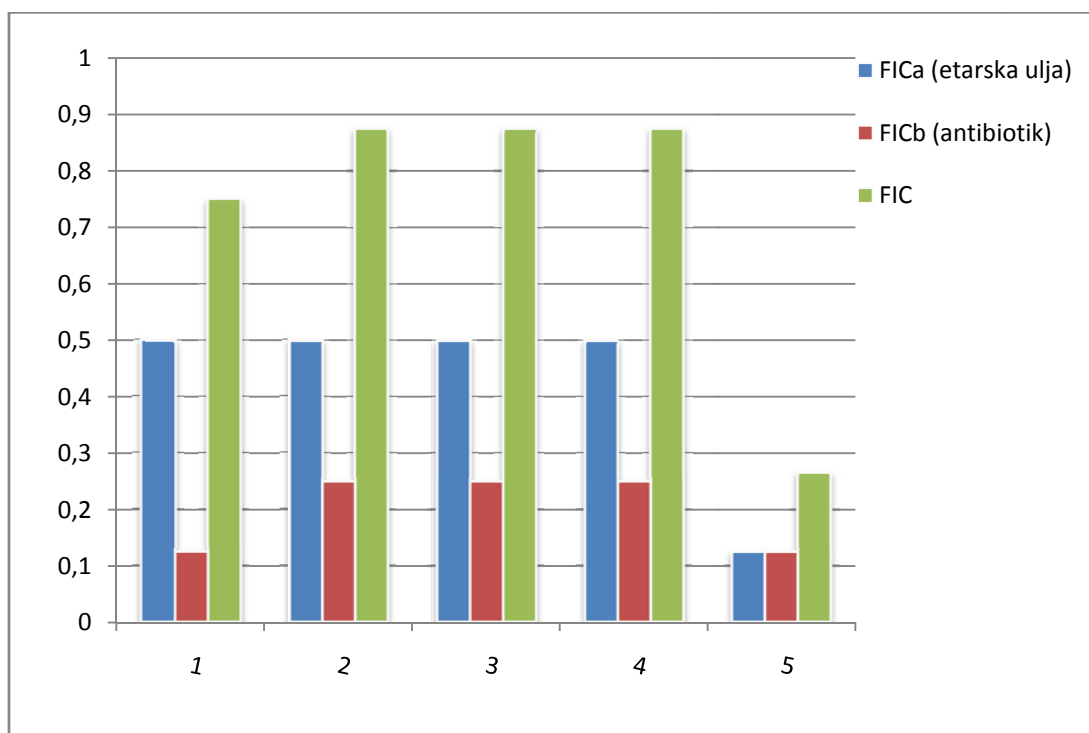


График 5-27. Синергистичко деловање етарског уља *A. panicii* са еритромицином у односу на изабране бактеријске сојеве.

(1) *S. aureus* (брис ране); (2) *S. pyogenes* (брис ране); (3) *E. faecalis* (брис ране); (4) *Acinetobacter* sp. (брис ране) и (5) *S. aureus* (брис носа). FIC – фракциона инхибиторна концентрација. SD= ± 0,02.

На основу добијених резултата можемо закључити да су испитиване комбинације етарског уља *A. sylvestris* и *A. panicii* и антибиотика еритромицина довеле до побољшања њиховог антимикуробног деловања, као и да су се вредности MIC за еритромицин значајно смањиле. Испитивање деловања етарског уља *Lippia sidoides* и тимола (доминатне компоненте у истом уљу) и аминогликозида против бактеријских сојева *P. aeruginosa* и *S. aureus* су показала да не постоји статистичка разлика између деловања етарског уља и тимола против *P. aeruginosa*, док је деловање тимола било значајније против соја *S. aureus*, као и да обе компоненте, етарско уље *Lippia sidoides* и тимол могу да допринесу побољшању антимикуробног деловања у интеракцији са аминогликозидима (Veras и сар., 2012). Ови подаци су у корелацији са резултатима испитивања која су показала способност етарских уља *Z. articulatum*, *V. arborea*, *L. microphylla* и *C. zehntneri* да делују са аминогликозидима и хиналонским антибиотикима и да повећају њихову активност против *S. aureus* и *P. aeruginosa* (Rodrigues и сар., 2009; 2010, Santos и сар., 2011, Coutinho и сар., 2010, 2011).

С обзиром на новије испитивање, у коме су тестирана етарска уља више биљних врста у комбинацији са еритромицином против 32 еритромицин-резистентна соја, као и на утврђено синергистичко деловање карвакрола (најактивније компоненте у испитиваним уљима) и еритромицина против 21 од 32 испитивана соја (Magi и сар., 2015), можемо закључити да су у овом истраживању добијени значајни резултати. Овако изражен синергизам у деловању против свих Грам (+) и Грам (-) испитиваних сојева, указује на то да је важан избор комбинације етарског уља и антибиотика и да, у случају добре комбинације, грађа спољашње мембране код Грам (-) бактерија престаје да буде важан фактор резистенције (Илић и сар., 2014).

5.2. *IN VITRO* КОНТРОЛА ПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА ПОРЕКЛОМ ИЗ ХУМАНОГ МАТЕРИЈАЛА ДЕЛОВАЊЕМ МЕТАНОЛНИХ ЕКСТРАКАТА

5.2.1. Компаративна анализа антиоксидативне активности метанолних екстраката одабраних биљних врста

У метанолним екстрактима је одређен укупни садржај флавоноида (изражен као број mg еквивалента рутина по g сувог узорка) и укупан садржај полифенола (изражен као број mg еквивалента галне киселине по g сувог узорка). Антирадикалска и антиоксидативна активност узорака је тестирана уз помоћ метода: DPPH (2,2-дифенил,1-пикрил хидразил) радикалска активност, ABTS (2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) радикалски капацитет (изражен као број mmol еквивалента тролокса по g сувог узорка), TRP (total reducing power) тј. укупна редукциона моћ (изражена као број mg еквивалента аскорбинске киселине по g сувог узорка), FRAP (Ferric reducing antioxidant power) тј. редукциона антиоксидативна моћ према Fe (изражена као број mmol Fe по g сувог узорка).

Добијени резултати су приказани у Табели 5-14. као и на графицима 5-28 и 5-29.

Табела 5-14. Антиоксидативне карактеристике метанолних екстраката биљних врста *T. parthenium*, *A. grandifolia*, *A. crithmifolia*, *A. absinthium*, *L. latifolium*, *A. pancicii*, *A. sylvestris* и *H. officinalis*

	<i>T.parthe nium</i>	<i>A.gradi folia</i>	<i>A.crithmi folia</i>	<i>A.absin thium</i>	<i>L.lati folium</i>	<i>A.panci cii</i>	<i>A.sylve stris</i>	<i>H.offici nalis</i>
DPPH-RSC	80.65±	86.56±	91.40±	91.40±	80.70±0	76.88±	35.75±	82.85
(%)	0.9	0.8	0.8	0.7	.6	0.5	0.3	±1.0
TRP	48.34±	61.05±	78.55±.	49.49±	47.83±0	38.34±	17.74±	55.57±
mg AAE/g	0.3	0.5	08	0.4	.4	0.3	0.2	0.6
DE								
FRAP	0.57±	0.74±	0.94±	0.59±	0.41±0.	0.24±	0.17±	0.73±
mmol Fe/g	0.0	0.1	0.1	0.0	0	0.0	0.0	0.0
DE								
ABTS	0.30±	0.45±	0.59±	0.31±	0.17±0.	0.17±	0.11±	0.39±
mmol TE/g	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0
DE								

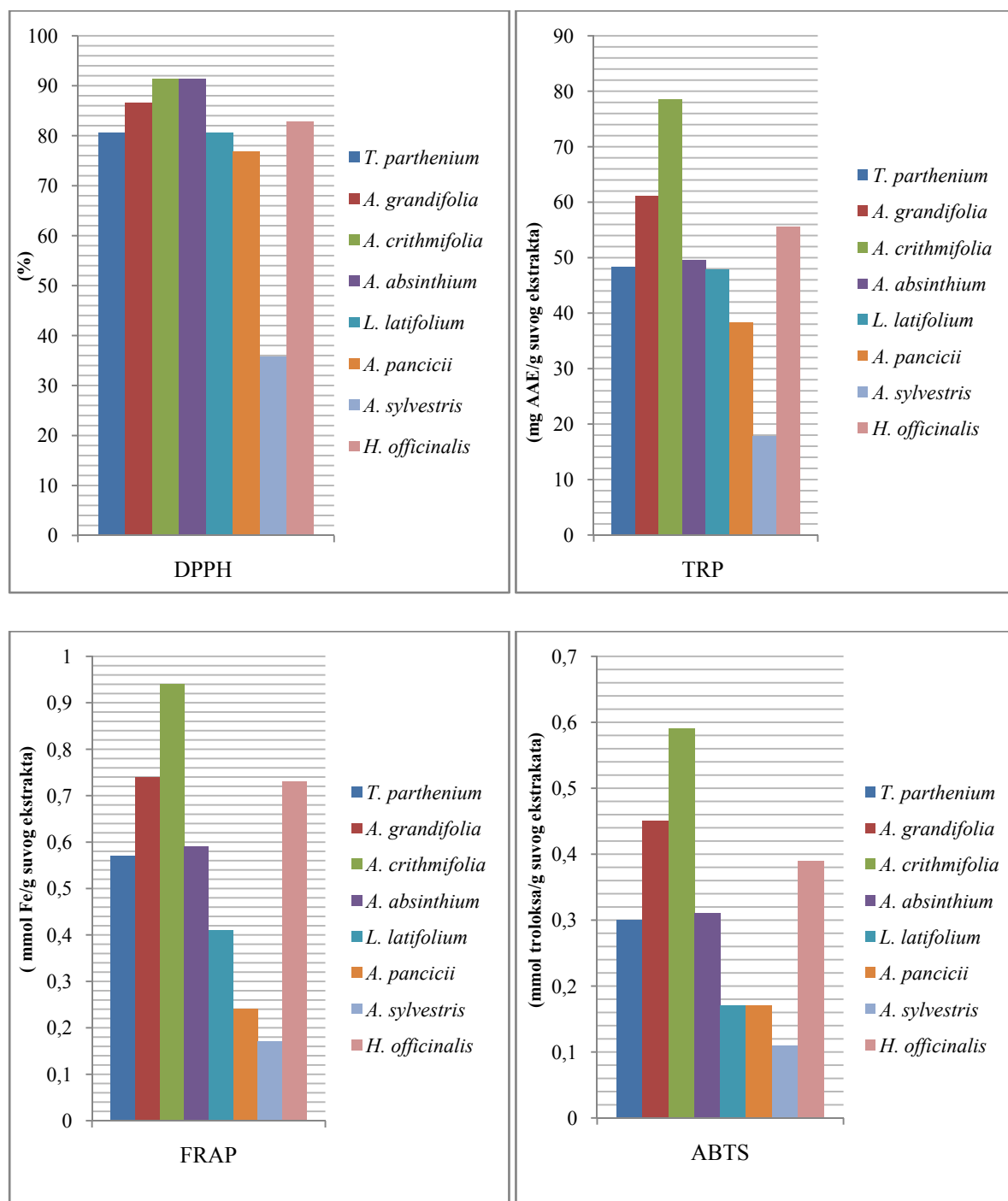


График 5-28. Антиоксидантне карактеристике метанолних екстраката испитиваних биљних врста: DPPH; TRP (изражен као еквивалент аскорбинске киселине у милиграмима по граму сувог екстракта); FRAP (изражен као mmol Fe²⁺ по граму сувог екстракта); ABTS (изражен као еквивалент mmol тролокса по граму сувог екстракта). Резултати су добијени израчунавањем средње вредности три понављања±стандардна девијација.

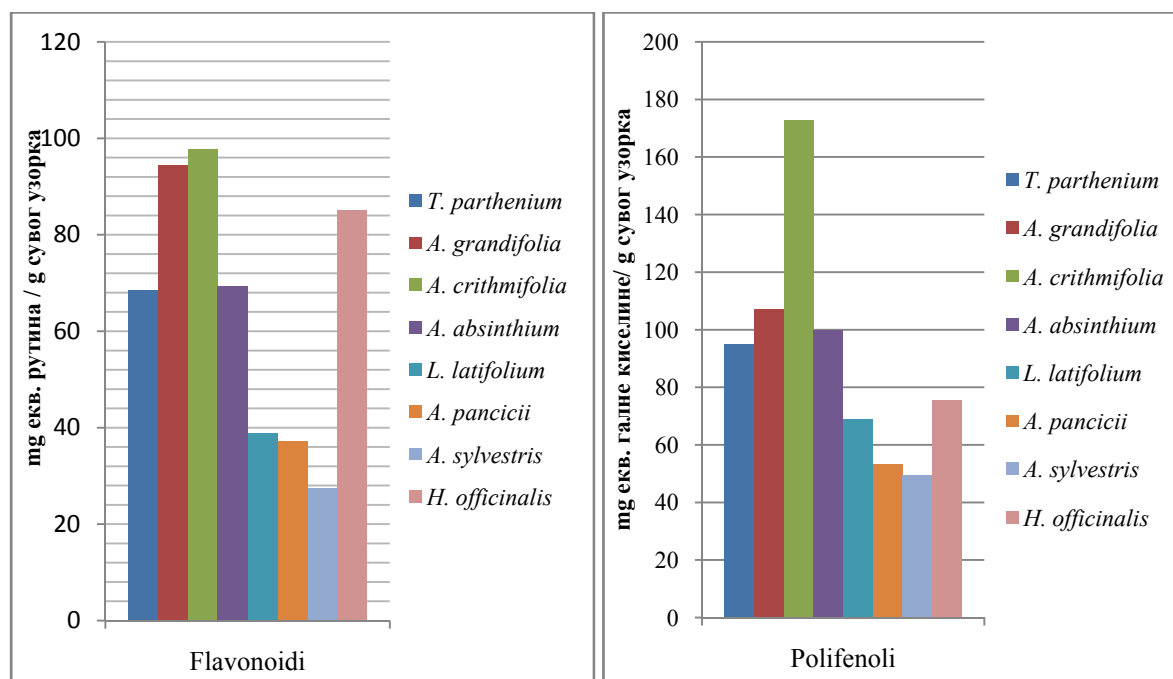


График 5-29. Садржај укупних флавоноида и укупних полифенола у метанолним екстрактима испитиваних биљних врста.

Резултати су добијени израчунавањем средње вредности три понављања $\pm$ стандардна девијација.

Све методе које смо користили за процењивање антиоксидативне активности (DPPH, ABTS, TRP, FRAP), су потврдиле да је распоред активности тестираних биљних врста следећи: *A. crithmifolia* > *A. grandifolia* > *H. officinalis* > *A. absinthium* > *T. parthenium* > *L. latifolium* > *A. panicii* > *A. sylvestris*.

Хемијска структура фенолних киселина се сматра разлогом за њихову антиоксидативну активност. Антиоксидативна активност полифенола се приписује хидроксилним групама, али то није једини фактор који одређује њихову антиоксидативну активност (Chen, Ho, 1997).

Метилувани и гликозидни деривати кверцетина, лутеолина и апигенина су били изоловани и идентификовани из метанолних екстракта надземних делова *A. crithmifolia*. Испитивана је и њихова антибактеријска и антибактериофагна активност (Tzakou и сар., 1996). Антиоксидативни капацитет 15 врста *Achillea* L. (Asteraceae) из Турске је испитиван помоћу неколико метода и добијени резултати су јасно показали да су инфузије свих испитиваних врста поседовале добар антиоксидативни капацитет. Ови резултати су у складу са утврђеним садржајем укупних полифенола и флавоноида (Konyalioglu, Karamenderes, 2004). У доступној литератури нема података о антиоксидативној активности метанолних екстракта биљних врста *A. grandifolia* и *A. crithmifolia*. Тестирани екстракти су показали изузетне карактеристике. Од свих

испитиваних екстраката, метанолни екстракт *A. crithmifolia* је имао највећи садржај полифенола 172,95 mg ГА/g сувог екстракта и флавоноида 97,70 mg РЕ/g сувог екстракта. Овај екстракт је показао највећи антиоксидативни капацитет према DPPH (91,40 %) и ABTS (0,59 mmol TE/g сувог екстракта) тестовима (Станковић и сар., 2015).

Биљна врста *T. parthenium* садржи велики број активних супстанци, али је узрок активности вероватно заснован на присуству сесквитерпенских лактона, укључујући партенолиде који доказано поседују битна профилактичка својства код мигрене и артритиса. Друге активне компоненте укључују флавоноидне гликозиде и пинен (Pareek и сар., 2011). *T. parthenium* у праху, екстрахован 80% етанолом, садржао је камфор, партенолиде, лутеолин и апигенин у концентрацији (0,30 %; 0,22% ; 0,84% и 0,68%, редом). Резултати које смо добили DPPH методом (80,64%) су у сагласности са ранијим истраживањима (84,4%) али је утврђена разлика у садржају полифенола 21,21 mg ГА/g сувог екстракта који су у нашем случају износили 94,894mg ГА/g сувог екстракта (Changqing et al., 2006) (), што може бити последица различитог начина екстракције.

Фитохемијска студија надземних делова *H. officinalis* пореклом из Кине довела је до изолације два нова флавоноида (кверцетин 7-О-б-дапиофуранизол-(1→2)-б-дксилопиранозоида (1) и кверцетин 7-О-б-Д-апиофуранозил-(1→2)-б-Д-ксилопиранозоид 30-Об-Д-глукопиранозоид (2) и девет од раније познатих (апигенин (3), апигенин 7-О-б-Д- глукопиранозоид (4), апигенин 7-О-б-Д- глукуронопинанозид метил естер (5), лутеолин (6), апигенин 7-О-б-Д-глукуронид (7), апигенин 7-О-б-Д-глукуронопиранозид бутил естер (8), лутеолин 7-О-б-Д-глукопиранозид (9), диосмин (10) и акацетин 7-О-а-Л-рамнопиранозил-(1→6)-б-Д-глукопиранозид (11). Антирадикалска активност ових компоненти одређена је DPPH методом. Утврђено је да испитиване компоненте поседују битну антирадикалску активност (Wang, Yang, 2010). У студији са шест различитих *in vitro* метода за утврђивање антирадикалских и антиоксидативних својстава метанолних екстраката надземних делова *H. officinalis* L. *var. angustifolius* утврђена је антиоксидативна активност у распону од средње до јаке (Ebrahimzadeh и сар., 2010). Антиоксидативна активност етанолних екстраката цветова, листова и стабљика *H. officinalis var. angustifolius* била је испитивана различитим *in vitro* методама (Alinezhad и сар., 2013). Екстракти су показали добру антиоксидативну активност. IC₅₀ код DPPH теста је био 148,8 µg/mL код цветова, 79,9 µg/mL код стабљика и 208,2 µg/mL код листова. Сви екстракти су показали средњу Fe²⁺ хелатну

способност. Антирадикална активност и редукциона моћ екстракта врсте *H. officinalis* је била висока по оба испитивана критеријума. Осим тога, од фенолних киселина, гална киселина се показала као најактивнија компонента у везивању слободних радикала, а кофеинска киселина је имала највећу редукциону моћ (Ludmila, Viera, 2005). Метанолни екстракти *H. officinalis* су имали богату разноврсност фенолних компонената, нарочито у хлорогенском, протокатехинском, ферулинском, сиригинском, п-хидроксibenзојевом и кофеинском киселином, а затим и ванилинском, п-кумаринском, рузмаринском и гентисинском киселином (Murakami и сар., 1998; Varga и сар., 1998; Kochan и сар., 1999; Zgorka, Głowniak, 2001). Наша истраживања су у сагласности са претходним наводима (Станковић и сар., 2015). Метанолни екстракти врсте *H. officinalis* су испољили умерену ка повишеној активности у свим методама испитивања (DPPH, TRP и FRAP = 82,85%; 55,57 mg AAE/g сувог екстракта,; 0,73 mmol екв Fe/g сувог екстракта, редом), а претпоставља се да је највероватнији узрок овакве активности присуство полифенолних компоненти.

Код хлороформских екстракта надземних делова *L. latifolium*, сесквитерпеноид ласерпитин, ацетилдезоксодехидроласерпитин, фенолпропаноид ласерин и латифолон су изоловани као главне компоненте, а екстракти су испитивани због цитотоксичних својстава (Поповић и сар., 2013). Метанолни екстракт врсте *L. latifolium* у нашем испитивању је имао умерену антиоксидативну активност (TRP 47,83mg AAE/g сувог екстракта, FRAP 0,41 mmol екв Fe/g сувог екстракта, ABTS 0,17 mmol TE/g сувог екстракта, DPPH 80,70%), што је у потпуности у складу са садржајем полифенола у екстракту (68,91 mg ГА екв/g сувог екстракта).

Метанолни екстракт врсте *A. panicii* је садржао нешто више полифенола и флавоноида (53,30 mg екв ГА/g сувог екстракта, 37,17 mg екв РЕ/ сувог екстракта) у поређењу са метанолним екстрактом *A. sylvestris* (49,64 mg екв ГА/g сувог екстракта, 37,17 mg екв РЕ/g сувог екстракта). Метанолни екстракт врсте *A. panicii* је испољио скоро два пута већу активност по DPPH тесту (76,88%), у поређењу са метанолним екстрактом *A. sylvestris* (35,75%).

Укупан садржај полифенола и флавоноида у метанолним екстрактима уклапа се у међусобно зависне антиоксидативне активности и одговара антиоксидативним својствима проучаваних екстраката. Редослед укупног садржаја флавоноида и полифенола у екстрактима је исти као и секвенци код антиоксидативне активности, што потврђује да су полифеноли и флавоноиди главни носиоци антиоксидативне

активности ових биљака. Представници фамилије Asteraceae (*A. crithmifolia*, *A. grandifolia* и *A. absinthium*) су показали најбоља антиоксидативна својства, фамилије Lamiaceae (*H. officinalis*) слабија од њих, а представници фамилије Apiaceae (*A. sylvestris*, *A. panicii* и *L. latifolium*) најслабија.

5.2.2. Компаративна анализа антибактеријског деловања метанолних екстраката одабраних биљних врста

Употреба биљних екстраката, као и других облика алтернативне медицине ужива велику популарност у новије време. Резултати биолошких, хемијских и фармаколошких испитивања дају обећавајуће резултате у том погледу. Извештаји о фармаколошким својствима појединих биљака воде ка њиховој примени у терапијске сврхе. Скрининг антимикробног деловања биљних екстраката и других биљних производа указује на њихова антиинфективна својства, као и на њихов значај у борби против резистентних микроорганизама.

Поред мноштва нутријената, биљке садрже и полифенолна једињења. Полифенолна једињења су секундарни метаболити биљака различитих структурних карактеристика, са фенолним језгром као основним конститuentом. Фенолне киселине и флавоноиди су од свих полифенола најчешћи предмет научних истраживања. У флавоноиде спадају: флавони, изофлавоноиди, флаванони, флаванолни, флаван-3-оли, катехини, антоцијанидини, лауроантоцијанидини, халкони, дихидрохалкони и аурони. Полифенолна једињења су од велике важности за биљке јер граде интегрални део структуре ћелијског зида, углавном као полимери (лигнини). Ове структуре служе као механичка баријера у одбрани од микроорганизама. Имају улогу у антиоксидантним и антиинфламаторним деловањима биљака (Sakurai и сар., 2010; Chang и сар., 2013), у инхибирању бактеријских, вирусних и гљивичних инфекција, као и у спречавању развоја тумора (Миладиновић, 2015). Доказано је да се у условима стреса (прекомерно УВ зрачење, оштећење ткива, инфекција) у биљкама индукује синтеза полифенолних једињења (Britton, 1983; Dixon, Paiva, 1995). Важна је улога и флавоноида, нарочито антоцијана у комбинацији са флавоноидима и флавонолима, који учествују у формирању боје воћа и цвећа (Harborne, 1994; Strack, 1997). Значајна улога флавоноида и фенолних киселина је и њихово учешће у одбрамбеном механизму биљака. Доказано је да су флавоноиди изузетно значајни и ефикасни у везивању слободних радикала у биљном ткиву, па због тога имају све већу улогу и у прехранбеној и фармацеутској индустрији.

Поред тога, они су веома важни и због њихове улоге у заштити од канцера, као и у превенцији коронарних и других обољења (Марин, 2003).

Антибактеријска активност метанолних екстраката биљних врста *T. parthenium*, *A. grandifolia*, *A. crithmifolia*, *A. absinthium*, *L. latifolium*, *A. pancicii*, *A. sylvestris* и *H. officinalis* је, уз помоћ микродилуционе методе тј. одређивањем минималне инхибиторне концентрације (МИС) и минималне бактерицидне концентрације (МВС), испитивана против 16 изолованих мултирезистентних сојева: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*.

Добијени резултати антимикуробне активности метанолних екстраката испитиваних биљних врста су сумирани и приказани у табелама 5-15 и 5-16.

Табела 5-15. Антибактеријска активност метанолних екстраката биљних врста из фамилија Ариасеае и Lamiaceа (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала. Различита слова означавају значајне разлике између средњих вредности на $p < 0,05$ – Тукеј тест.

Изоловани бактеријски сојеви	Метанолни екстракт (MIC/MBC у mg/mL)			
	<i>Laserpitium latifolium</i>	<i>Angelica pancicii</i>	<i>Angelica sylvestris</i>	<i>Hyssopus officinalis</i>
Брисеви рана				
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,0 ^b /100 ^a	25,0 ^b / $>100^a$	25,0 ^b / $>100^a$	50,0 ^a / $>100^a$
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6,25 ^c /100 ^a	12,5 ^b /25 ^c	12,5 ^b /100 ^a	12,5 ^b / $>100^a$
<i>Enterococcus faecalis</i>	12,5 ^b / $>100^a$	12,5 ^b / $>100^a$	25,0 ^a / $>100^a$	25,0 ^a /100 ^a
<i>Escherichia coli</i>	25,0 ^b / $>100^a$	50,0 ^a / $>100^a$	50,0 ^a / $>100^a$	25,0 ^b /100 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25,0 ^b / $>100^a$	12,5 ^c / $>100^a$	12,5 ^c /100 ^a	50,0 ^a / $>100^a$
<i>Acinetobacter</i> sp.	50,0 ^b /100 ^a	100 ^a / $>100^a$	100 ^a /100 ^a	100 ^a / $>100^a$
<i>Proteus mirabilis</i>	50,0 ^b /100 ^a	50,0 ^b /100 ^a	50,0 ^b /100 ^a	100 ^a / $>100^a$
<i>Klebsiella</i> sp.	25,0 ^c /100 ^a	50,0 ^b / $>100^a$	50,0 ^b / $>100^a$	25,0 ^a / $>100^a$
Брисеви носа				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	12,5 ^c / $>100^a$	25,0 ^b / $>100^a$	25,0 ^b /100 ^a	25,0 ^b / $>100^a$
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,0 ^b / $>100^a$	50,0 ^a / $>100^a$	50,0 ^a / $>100^a$	50,0 ^a / $>100^a$
Брисеви грла				
<i>Streptococcus pyogenes</i>	12,5 ^c /50 ^b	25,0 ^b /100 ^a	25,0 ^b /50 ^b	50,0 ^a /100 ^a
<i>Escherichia coli</i>	25,0 ^c / $>100^a$	50,0 ^a / $>100^a$	50,0 ^b / $>100^a$	100 ^a / $>100^a$
Спутум				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	12,5 ^d /100 ^a	12,5 ^d /50 ^b	25,0 ^c /50 ^b	50,0 ^b / $>100^a$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	25,0 ^c /100 ^a	25,0 ^c /100 ^a	25,0 ^c /100 ^a	100 ^a / $>100^a$
<i>Klebsiella</i> sp.	25,0 ^b /100 ^a	50,0 ^a / $>100^a$	50,0 ^a / $>100^a$	25,0 ^b / $>100^a$
Аспират				
<i>Escherichia coli</i>	25,0 ^c / $>100^a$	50,0 ^b / $>100^a$	50,0 ^b / $>100^a$	100 ^a / $>100^a$

Табела 5-16. Антибактеријска активност метанолних екстраката биљних врста из фамилије Asteraceae (MIC/MBC у mg/mL) против патогених бактерија изолованих из хуманог материјала. Различита слова означавају значајне разлике између средњих вредности на $p < 0,05$ – Тукеј тест

Иоловани бактеријски сојеви	Метанолни екстракти (MIC/MBC у mg/mL)			
	<i>Tanacetum parthenium</i>	<i>Achillea grandifolia</i>	<i>Achillea crithmifolia</i>	<i>Artemisia absinthium</i>
Брисеви рана				
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,0 ^b /100 ^a	25,0 ^b / $>100^a$	12,5 ^c /100 ^a	25,0 ^b /100 ^a
<i>Streptococcus pyogenes</i>	12,5 ^b /12,5 ^d	12,5 ^b /100 ^a	25,0 ^a /50 ^b	12,5 ^b / $>100^a$
<i>Enterococcus faecalis</i>	12,5 ^b /100 ^a	12,5 ^b /100 ^a	25,0 ^a /100 ^a	25,0 ^a / $>100^a$
<i>Escherichia coli</i>	25,0 ^b /50 ^b	50,0 ^a /50 ^b	25,0 ^b /50 ^b	25,0 ^b / $>100^a$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5 ^c /100 ^a	12,5 ^c / $>100^a$	25,0 ^b /100 ^a	50,0 ^a /100 ^a
<i>Acinetobacter</i> sp.	25,0 ^c /100 ^a	50,0 ^b /100 ^a	12,5 ^d /100 ^a	50,0 ^b /100 ^a
<i>Proteus mirabilis</i>	50,0 ^b /100 ^a	50,0 ^b /100 ^a	50,0 ^b /50 ^b	50,0 ^b /100 ^a
<i>Klebsiella</i> sp.	25,0 ^c / $>100^a$	25,0 ^c / $>100^a$	12,5 ^d /100 ^a	50,0 ^b / $>100^a$
Брисеви носа				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25,0 ^b /100 ^a	25,0 ^b /100 ^a	12,5 ^c /100 ^a	50,0 ^a / $>100^a$
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,0 ^b /100 ^a	25,0 ^b /100 ^a	25,0 ^b /100 ^a	25,0 ^b /100 ^a
Брисеви грла				
<i>Streptococcus pyogenes</i>	12,5 ^c /100 ^a	12,5 ^c /100 ^a	12,5 ^c /100 ^a	25,0 ^b /100 ^a
<i>Escherichia coli</i>	25,0 ^c /100 ^a	25,0 ^c /100 ^a	25,0 ^c /100 ^a	50,0 ^b / $>100^a$
Спутум				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	12,5 ^d /100 ^a	12,5 ^d /50 ^b	12,5 ^d /100 ^a	12,50 ^d / $>100^a$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	25,0 ^c /100 ^a	12,5 ^d /100 ^a	25,0 ^c /100 ^a	50,0 ^b /100 ^a
<i>Klebsiella</i> sp.	25,0 ^b / $>100^a$	50,0 ^a /100 ^a	25,0 ^b /100 ^a	50,0 ^a / $>100^a$
Аспират				
<i>Escherichia coli</i>	25,0 ^c /100 ^a	25,0 ^c /100 ^a	25,0 ^c /100 ^a	50,0 ^b /100 ^a

За метанолне екстракте одабраних биљних врста су тестиране концентрације у опсегу од 0,05 до 100,00 mg/mL. Минималне инхибиторне концентрације (MIC) су се кретале у опсегу концентрација од 6,25 mg/mL (деловање екстраката *L. latifolium* против *S. pyogenes* из бриса ране, што представља најбољи резултат) до 100,00 mg/mL

(деловање екстракта *A. panicii*, *A. sylvestris* и *H. officinalis* против *Acinetobacter* sp. из бриса ране), као и активност екстракта *H. officinalis* против *P. mirabilis* из бриса ране, *E. coli* из бриса грла и аспирата и *P. aeruginosa* 2 из спутума. Минималне бактерицидне концентрације (МБС) су се кретале у опсегу концентрација од 12,50 mg/mL (активност екстракта *T. parthenium* против *S. pyogenes* из бриса ране) до 100,00 mg/mL.

Екстракт *H. officinalis* је показао веома слабо антимикробно деловање. МИС вредности су биле у опсегу концентрација од 12,50-100,00 mg/mL, а МБС вредности су изостале осим у случајевима деловања против сојева *E. coli* и *E. faecalis* из бриса рана и *S. pyogenes* из бриса грла. Најнижа МИС вредност је детектована код соја *S. pyogenes* из бриса ране (МИС=12,50 mg/mL), док је код сојева *E. faecalis*, *E. coli* и *Klebsiella* sp. из бриса ране, *S. pneumoniae* из бриса носа и *Klebsiella* sp. из спутума износила 25,00 mg/mL. Овако слаба антимикробна активност је забележена и у радовима других истраживача (Ozer и сар., 2006; Proestos и сар., 2005). Само у једном случају је метанолни екстракт *H. officinalis* испољио значајнију антимикробну активност против соја *P. aeruginosa* који је био резистентан на деловање антибиотика хлорамфеникола (Shinwari и сар., 2009).

Екстракт *T. parthenium* је показао најјачу активност против *S. pyogenes* и *E. coli* из бриса ране (МИС/МБС=12,50/12,50 mg/mL и 25,00/50,00 mg/mL). Код осталих сојева МБС вредности су биле 100 mg/mL или веће од највише тестиране концентрације (>100 mg/mL). Подаци о антимикробној активности метанолних екстраката ове врсте нису нађени.

Екстракт *A. grandifolia* је био најефикаснији против *P. aeruginosa* из спутума (МИС/МБС=12,50/50,00 mg/mL) и *E. coli* из бриса ране (МИС/МБС=50,00/50,00 mg/mL). Запажене МИС вредности у концентрацији 12,50 mg/mL су забележене и код сојева *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* из бриса ране, *S. pyogenes* из бриса грла и сојева *P. aeruginosa* (1) и (2) из спутума. Подаци о антимикробној активности метанолних екстраката ове врсте нису пронађени у доступној литератури.

Екстракт *A. crithmifolia* је показао најизразитију активност против *S. pyogenes*, *E. coli* и *P. mirabilis* из бриса ране (МИС/МБС=25,00/50,00 mg/mL; 25,00/50,00 mg/mL и 50,00/50,00 mg/mL), док се бактерицидна активност против свих тестираних сојева кретала између 50-100 mg/mL. Најниже МИС вредности у концентрацији од 12,50 mg/mL су забележене код сојева *S. aureus*, *Acinetobacter* sp., и *Klebsiella* sp. из бриса ране, *S. pneumoniae* из бриса носа, *S. pyogenes* из бриса грла и соја *P. aeruginosa* (1) из

спутума. У скорашњој студији метанолни екстракти *A. crithmifolia* су у ниским концентрацијама показали активност против *S. aureus* (MIC=100 µL/mL) и *B. cereus* (MIC=200 µL/mL), али је антибактеријска активност изостала против *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* и *E. faecalis* (Karaalp и сар., 2009).

Екстракт биљне врсте *A. absinthium* је скоро код свих бактеријских сојева показао слаб антибактеријски потенцијал. MIC вредности су се кретале у распону од 12,50 mg/mL (*S. pyogenes* из бриса ране и *P. aeruginosa* (1) из спутума), преко 25,00 mg/mL (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* из бриса ране, *S. aureus* из бриса носа, *S. pyogenes* из бриса грла), до 50,00 mg/mL (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* sp. из брисева рана, *S. pneumoniae* из бриса носа, *E. coli* из бриса грла, *P. aeruginosa* (2) и *Klebsiella* sp. из спутума и *E. coli* из аспирата), док су MBC вредности код свих сојева биле 100,00 mg/mL или их није било могуће детектовати (>100,00 mg/mL). То одговара резултатима за антибактеријску активност метанолних екстраката исте врсте из Турске. Активност је детектована само против *E. coli* (зона инхибиције 10 и 7 mm) и *P. aeruginosa* (9 mm), док против осталих тестираних сојева (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *Enterobacter cloacae*) екстракти нису били активни (Baykan Erel и сар., 2012). Међутим, у једној студији је представљена добра активност метанолних екстраката против сојева *B. subtilis*, *B. cerus*, *S. typhimurium*, *S. thermophilus*, *P. putida* (зона инхибиције од 13-19 mm) и они су се показали активнијим од референтних антибиотика (Sengul и сар., 2011).

Екстракт *L. latifolium* је инхибиторно деловао у најнижим концентрацијама против свих тестираних сојева (MIC од 6,25-50,00 mg/mL), а најбољу активност је показао против *S. pyogenes* из бриса грла (MIC/MBC=12,50/50,00 mg/mL). Бактерицидне концентрације су, осим у наведеном случају, износиле 100 mg/mL или нису могле бити детектоване (>100 mg/mL). Ниске MIC вредности су забележене код соја *S. pyogenes* из бриса ране (MIC=6,25mg/mL) и сојева *E. faecalis* из бриса ране, *S. pneumoniae* из бриса носа, *S. pyogenes* из бриса грла и соја *P. aeruginosa* (1). Подаци о антимикробној активности метанолних екстраката ове врсте нису пронађени у доступној литератури.

Екстракт *A. panicii* је показао добру антимикробну активност против соја *S. pyogenes* из бриса ране (MIC/MBC=12,50/25,00 mg/mL) и *P. aeruginosa* из спутума (MIC/MBC=12,50/50,00 mg/mL), док је екстракт *A. sylvestris* деловао најбоље против *S. pyogenes* из бриса грла (MIC/MBC=25,00/50,00 mg/mL). Оба екстракта су добро против

соја *P. aeruginosa* (1) из спутума са вредностима за MIC/MBC=25,00/50,00 mg/mL (екстракт *A. panicii*) и са вредностима 12,50/50,00 mg/mL (екстракт *A. sylvestris*), али бактерицидне концентрације против осталих сојева су биле 100,00 mg/mL или активност није утврђена. Подаци о антимикробној активности метанолних екстраката *A. panicii* нису нађени, док је екстракт *A. sylvestris* и у другим истраживањима такође показао слабу активност и против биљних патогена (*Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas glycinea*) (Брковић и сар., 2006) и против патогена из хуманог материјала (*E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* (МРСА) (Sarker и сар., 2003).

Антимикробна активност метанолних екстраката испитиваних биљних врста је опадала следећим редом: *A. crithmifolia* > *T. parthenium* > *A. grandifolia* > *L. latifolium* > *A. sylvestris* > *A. absinthium* > *A. panicii* > *H. officinalis*.

Најјачу активност су имали екстракти биљних врста *A. crithmifolia* и *T. parthenium* са инхибиторним/бактерицидним ефектом у опсегу концентрација од 12,50-100,00 mg/mL против свих тестираних сојева (са изузетком соја *Клебсиелла* сп. изолованог из ране). Метанолни екстракт врсте *H. officinalis* је деловао најслабије. Он није имао никакву бактерицидну активност (изузев против *E. faecalis* и *E. coli* изолованих из брисева рана и *S. pyogenes* из бриса грла). Екстракти свих биљака су били неактивни и у највишој тестираној концентрацији (100,00 mg/mL) против *Klebsiella* сп. из бриса ране (изузев екстракта *A. crithmifolia* и *L. latifolium*) и *E. coli* из бриса грла (изузев екстраката *T. parthenium*, *A. grandifolia* и *A. crithmifolia*). Сви испитивани екстракти су имали инхибиторно/бактерицидни ефекат једино против соја *P. mirabilis* из бриса ране.

На основу података о садржају укупних фенола и флавоноида у метанолним екстрактима испитиваних биљака можемо закључити да у одређеној мери постоји корелација са подацима о антимикробној активности испитиваних биљака, што је посебно изражено код припадника рода *Achillea* (*A. crithmifolia* и *A. grandifolia*). Наиме, обе врсте *Achillea* су имале највиши садржај укупних флавоноида и полифенола од свих тестираних биљних екстраката (*A. crithmifolia* - 97,70±1,0 mgRE/g сувог екстракта и 172,9±1,7 mgGA/g сувог екстракта; *A. grandifolia* - 94,46±0,9 mg RE/g сувог екстракта и 107,2±1,2 mg GA/g сувог екстракта), што доводимо у везу и са њиховим антибактеријским својствима, пошто су обе врсте показале и најјачу антибактеријску активност према тестираним сојевима. Флавоноиди су познати по својим

антимикробним својствима (Kaaplar и сар., 2009), а одређени полифеноли су препознати као потенцијални нови природни конзерванси у храни, али и као могуће нове компоненте у развијању средстава за борбу против мутирезистентних сојева бактерија (Daglia, 2012). Фенолне компоненте делују на бактеријске сојеве преко својих хидроксилних група тако што се везују за молекуле воде у бактеријским ћелијама и на тај начин онемогућавају динамичке процесе у њима. Оне такође, коагулишу протеине бактеријске ћелије и инактивишу ензиме укључене у синтезу аминокиселина неопходних за раст бактерија (Чанчаревић и сар., 2013).

Становиште да се само биљни екстракти са вредностима MIC испод 100 µg/mL могу сматрати потенцијалним антимикробним агенсима (Cos и сар., 2006), можда треба посматрати у светлу тога да су у овом раду тестирани високо мутирезистентни изолати, тако да се добијени резултати о антибактеријској активности метанолних екстраката испитиваних биљних врста могу сматрати значајним.

5.3. БИЉНЕ ВРСТЕ ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОР АНТИМИКРОБНИХ МАТЕРИЈА У РЕШАВАЊУ ПРОБЛЕМА РЕЗИСТЕНСИЈЕ

Резистенција се може развити мутацијом постојећих или трансфером нових гена. Нови гени који посредују у резистенцији обично се шире од ћелије до ћелије помоћу мобилних генетских елемената као што су *плазмиди*, *транспозони* или *бактериофаги*. Резистентне бактеријске популације размножавају се на местима честог коришћења антимикробних лекова, где се служе селективним предностима над осетљивом популацијом. Главни механизми које бактерије користе у одбрани од деловања антимикробних лекова су деструкција лека, алтерација или изражена производња антибактеријског циља, смањење пермеабилности ћелијског зида за лек и активна елиминација једињења из унутрашњости ћелије. Мутације које омогућавају резистенцију према бројним антибиотцима се јављају на протеинима (порини) спољашње мембране Грам (-) бактерија. Ове мутације утичу на пермеабилност бактерија за бета-лактаме, хинолоне, тетрациклине, хлорамфеникол и триметоприм. Бактерије које показују значајну резистентност на постојеће антибиотике су: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. (ванкомицин резистентан), *Klebsiella pneumoniae* (карбапенемаза продукујуће бактерије), *Staphylococcus aureus* (метицилин резистентан-MRCA), итд.

Подаци добијени у оквиру „SENTRY Antimicrobial Surveillance Program“ - а, (САД), указују на то да је 1993. године проценат изолата *K. pneumoniae* резистентних на цефтазидим и друге цефалоспорине треће генерације износио 6,6% (из узорак крви), 9,7% (из респираторног тракта-пнеумониа), 5,4% (из брисева ране) и 3,6% (из уринарног тракта) (Jones, 2001). У 2003. години, овај проценат је износио 20,6% од укупног броја узетих изолата *K. pneumoniae* (NNIS, 2003). Слично томе, између 1999. и 2003. године, проценат изолата *P. aeruginosa* резистентних на флуорохинолинске антибиотике порастао је са 23,0 на 29,5% (Fridkin, 2001). Такође, у тромесечном истраживању у 15 бруклинских болница (САД), у 1999. години, је утврђено да 53,0% сојева *A. baumannii* показује резистенцију ка карбапенемима, а 24,0% сојева *P. aeruginosa* је било резистентно на имипенем (Landman и сар., 2002). Сојеви рода *Acinetobacter* последњих година показују драматичан пораст у резистенцији на антибиотике. Врсте рода *Acinetobacter* могу преживети на сувим површинама и до 20 дана због чега поседују високу способност преношења и контаминације имунодефицијентних и осталих пацијената. Оне су иницијално резистентне на антибиотике укључујући и пеницилин и хлорамфеникол. Због тога се у новије време, за третман инфекција изазваних врстама рода *Acinetobacter*, испитују нове антимикробне терапије уз помоћ бактериофага (терапија уз помоћ виралних фага).

Као последица ових сазнања, етарска уља и екстракти биљака се јављају као потенцијални нови антимикробни агенаси који могу да буду важни у борби против резистентних бактерија. Етарска уља и екстракти биљака поседују велики број секундарних метаболита који имају, поред осталог и антимикробна својства. Ови биљни продукти самостално, али и синергистички, са појединим антибиотикима могу да делују инхибиторно на разне бактерије. Установљени су синергистички ефекти еугенол - линалол и еугенол - ментол комбинације које су инхибиторно утицале на сојеве *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* (Basseole и сар., 2010), као и антимикробно и синергистичко деловање између еритромицина и етарских уља *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *Mentha piperita* и *Melaleuca alternifolia* против 32 еритромицин-резистентна соја (Magi и сар., 2015). Карвакрол који је доминантна компонента у мајчиној душици и оригану је показао најјизраженије деловање, како појединачно, тако и у синергизму са еритромицином против 21 од 32 испитивана соја (Magi и сар., 2015). Такође, доказано је да су етарска уља *Zanthoxylum articulatum*, *Vanillosmopsis arborea*,

Lippia microphylla и *Croton zehntneri* реаговала са аминогликозидима и хиналонским антибиотикима и да су повећала њихову активност против *S. aureus* и *P. aeruginosa* (Rodrigues и сар., 2009, 2010; Santos и сар., 2011; Coutinho и сар., 2010, 2011). Деловање етарских уља на бактерије које су изазивачи инфекција код људи, нарочито у болничким условима у којима је присутно мноштво резистентних сојева, од великог је значаја. У испитивању деловања етарских уља три биљне врсте (*Cinnamomum cassia*, *Coriandrum sativum* и *Ziziphora hispanica*) против 18 референтних и мултирезистентних клиничких сојева, који су изазивачи уринарних инфекција, установљено је да је етарско уље *C. cassia* деловало најбоље против свих тестираних сојева са МИС вредностима које нису прелазиле 5 mg/mL (Zenati и сар., 2014). Коначно, врло је важно и антимикумно деловање етарских уља и екстракта биљака против бактерија које стварају биофилм, услед повећане резистентности таквих бактерија на деловање антибиотика. Етарска уља *Cinnamomum cassia*, *Myroxylon balsamum* и *Thymus vulgaris*, су била ефикаснија у ерадикацији бифилм продукујућих *P. aeruginosa* и *S. aureus* од тестираних признатих антибиотика, те их ова констатација квалификује у ред значајних кандидата у третману биофилма (Kavanaugh и сар. 2012).

Због претходно наведеног, као значајан резултат овога рада треба истаћи деловање етарских уља биљних врста *A. panicii*, *A. sylvestris* и *A. absinthium* против соја *Acinetobacter* sp. изолованог из бриса ране против кога, три од четири испитивана антибиотика, нису показала никакво деловање. Уља ових биљних врста су против тог соја деловала у концентрацијама од MIC=MBC=0,10 mg/mL (*A. panicii*), MIC/MBC=0,11/0,22 mg/mL (*A. sylvestris*) и MIC=MBC=4,72 mg/mL (*A. absinthium*) (график 5-30). Потребно је истаћи изражено антибактеријско деловање етарског уља *A. sylvestris* и против сојева *P. aeruginosa* из спутума (MIC/MBC=0,44/0,44 mg/mL) (график 5-31) који је познат по својој резистентности на постојеће антибиотике (Lambert, 2002), као и против сојева *P. mirabilis* и *Klebsiella* sp. из бриса ране (MIC/MBC=0,87/0,87 mg/mL) (графици 5-32 и 5-33) који такође заузимају важно место у групи резистентних бактерија (Bubonja-Šonje, Abram, 2014). И у овим случајевима су концентрације у којима је деловало етарско уље *A. sylvestris* према наведеним бактеријским сојевима биле ниже од концентрација у којима су деловали поједини тестирани антибиотици.

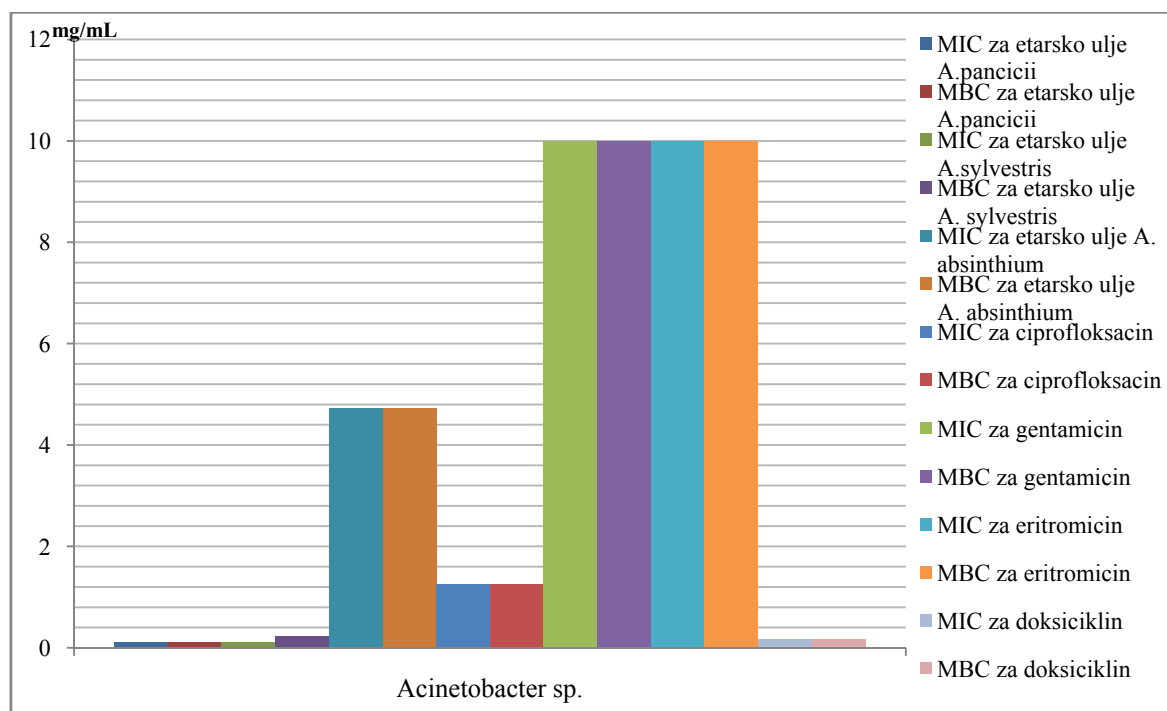


График 5-30. Антибактеријско деловање етарских уља биљних врста *A. panicii*, *A. sylvestris* и *A. absinthium* против соја *Acinetobacter* sp. изолованог из бриса ране у поређењу са референтним антибиотицима

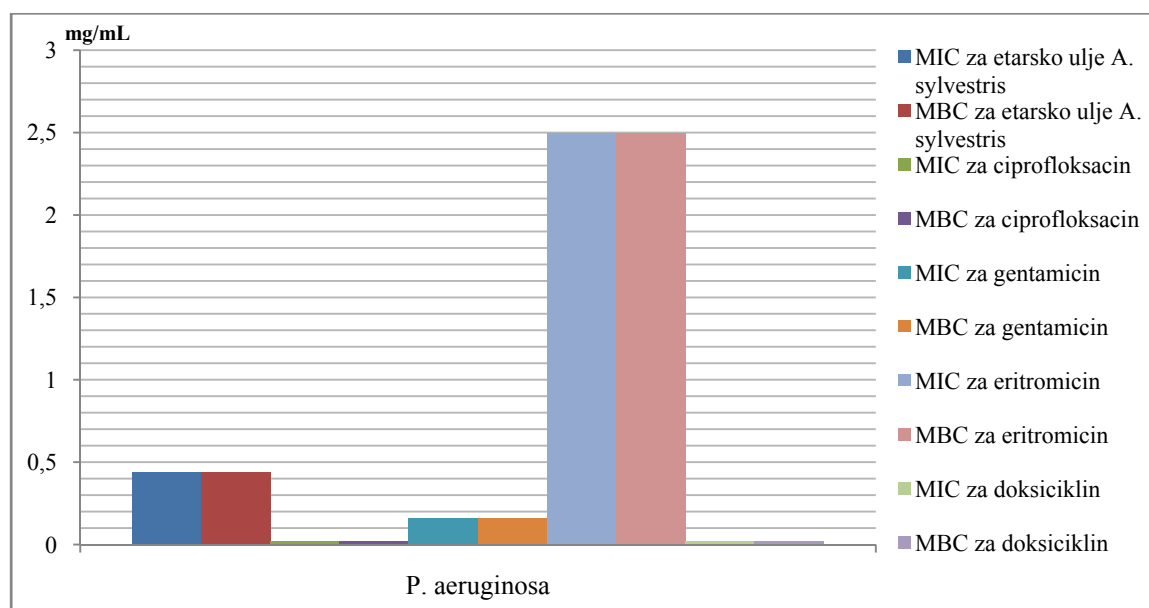


График 5-31. Антибактеријско деловање етарског уља врсте *A. sylvestris* против соја *P. aeruginosa* изолованог из спутима у поређењу са референтним антибиотицима

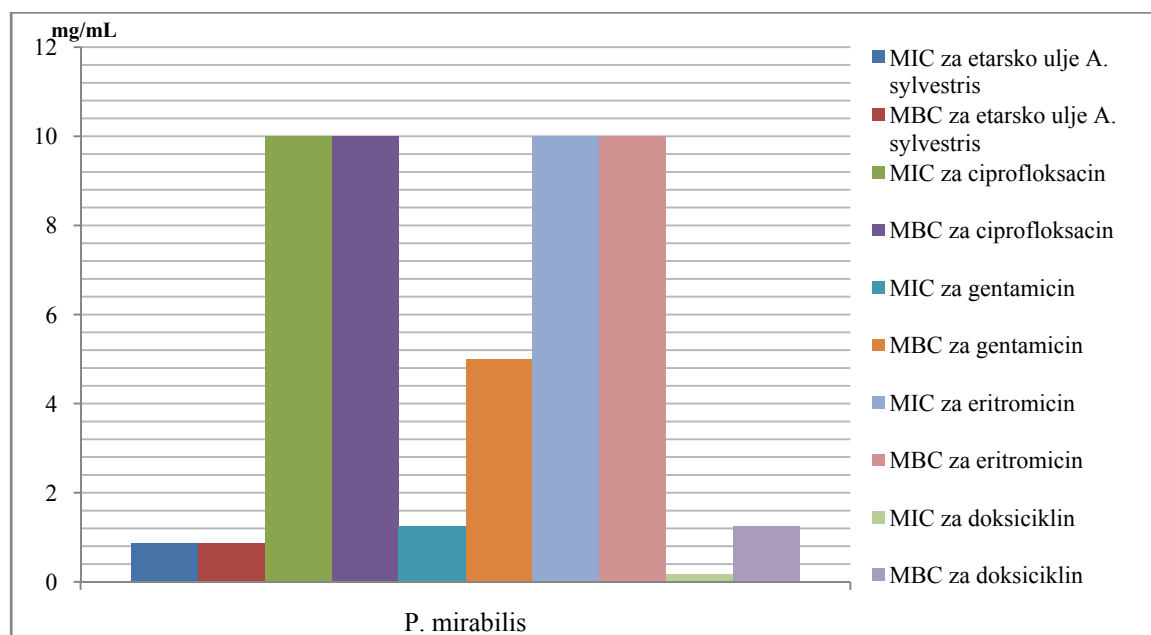


График 5-32. Антибактеријско деловање етарског уља врсте *A. sylvestris* против соја *P. mirabilis* изолованог из бриса ране у поређењу са референтним антибиотицима

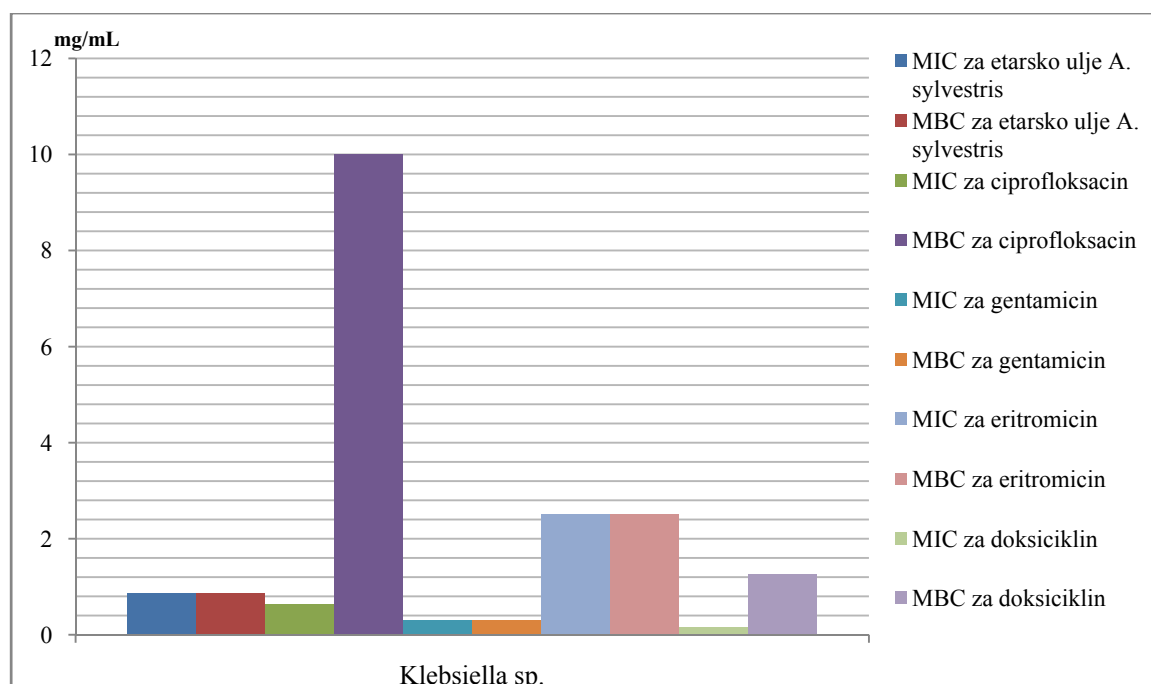


График 5-33. Антибактеријско деловање етарског уља врсте *A. sylvestris* против соја *Klebsiella sp.* изолованог из бриса ране у поређењу са референтним антибиотицима

6. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата изложених у овој докторској дисертацији можемо донети следеће закључке:

1. Међу 60 бактеријских клиничких изолата из брисева рана, носа, грла, спутума и аспирата пацијената, издвојено је 16 мултирезистентних сојева: *Escherichia coli* (брисеви рана, грла и аспират), *Pseudomonas aeruginosa* (брис ране и два изолата из спутума), *Klebsiella* sp. (брис ране и спутум), *Proteus mirabilis* (брис ране), *Acinetobacter* sp. (брис ране), *Staphylococcus aureus* (брис ране и носа), *Streptococcus pyogenes* (брис ране и грла), *Streptococcus pneumoniae* (брис носа) и *Enterococcus faecalis* (брис ране).
2. На основу литературних података утврђено је да биљне врсте *Hyssopus officinalis*, *Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Tanacetum parthenium*, *Artemisia absinthium*, *Laserpitium latifolium*, *Angelica sylvestris* и *Angelica panicicii* имају значајно место у традиционалној медицини, али су њихов фитохемијски састав, антиоксидативни статус и антимикуробни потенцијал недовољно испитани због чега су биле предмет ових испитивања.
3. Утврђено је да су све изабране врсте биљака продуценти етарских уља и да је њихов принос износио: *A. sylvestris* 0,05% (v/w), *A. absinthium* 0,12% (v/w), *A. panicicii* 0,14% (v/w), *H. officinalis* 0,17% (v/w), *L. latifolium* 0,16% (v/w), *A. crithmifolia* 0,22% (v/w), *A. grandifolia* 0,30% (v/w) и *T. parthenium* 0,57% (v/w).

Етарска уља одабраних биљних врста су показала присуство великог броја различитих једињења: *T. parthenium* (55), *A. absinthium* (53), *H. officinalis* (43), *A. panicicii* (40), *A. crithmifolia* (35), *A. sylvestris* (32), *A. grandifolia* (26) и *L. latifolium* (26).

У испитиваним етарским уљима као доминантне компоненте су идентификована следећа једињења: *A. crithmifolia* (артемизија кетон 31,7%, камфор 25,4% и 1,8-цинеол 14,8%), *A. grandifolia* (камфор 45,4%, 1,8-цинеол 16,4% и α -тујон 15,1%), *A. absinthium* (сабинен 21,5%, орто-цимен 19,2% и (з)-епокси-оцимен 11,0%), *H. officinalis* (1,8-цинеол 49,1% и изопинокамфон 22,69%), *L. latifolium* (сабинен 47,8% и α -пинен 25,0%), *T. parthenium*

- (камфор 51,4%, транс-хризантенил ацетат 22,7%, камфен 7,3%), *A. sylvestris* (лимонен 75,3% и α -пинен 9,6%), *A. panicii* (β -феландрен 54,9%, α -пинен 4,5% и α -феландрен 4,5%).
4. Антиоксидативна активност етарских уља је била највећа код уља биљне врсте *A. grandifolia*, а затим код етарских уља биљних врста *A. crithmifolia* и *A. absinthium*. Најнижу антиоксидативну активност је имало етарско уље врсте *H. officinalis*. Поређењем добијених резултата је установљено да је антиоксидативна активност етарских уља опадала следећим редоследом: *A. grandifolia* > *A. absinthium* > *A. crithmifolia* > *A. sylvestris* > *A. panicii* > *L. latifolium* > *T. parthenium* > *H. officinalis*.
 5. Антибактеријско деловање испитиваних етарских уља је испољено у интервалу концентрација од 0,10 до 93,2 mg/mL. Етарска уља су била ефикасна против свих испитиваних бактеријских сојева. Против већине сојева уља су деловала у опсегу концентрација од 21,45 – 46,60 mg/mL. Најбољи забележени резултат је био изузетна активност етарских уља *A. sylvestris* и *A. panicii* против соја *Acinetobacter* sp. из бриса ране, с обзиром на драматично повећање резистентности ове бактерије на постојеће антибиотике. Етарска уља су имала опадајућу антимикробну активност следећим редом: *Angelica sylvestris* > *Angelica panicii* > *Achillea crithmifolia* > *Artemisia absinthium* > *Achillea grandifolia* > *Laserpitium latifolium* > *Hyssopus officinalis* > *Tanacetum parthenium*, што је у прилично доброј корелацији са њиховом антиоксидативном активношћу.
 6. Метанолни екстракти одабраних биљних врста су имали следећи принос: *A. crithmifolia* 4,74% (v/w), *H. officinalis* 5,10% (v/w), *A. sylvestris* 6,20% (v/w), *T. parthenium* 7,09% (v/w), *A. grandifolia* 7,32% (v/w), *L. latifolium* 7,40% (v/w), *A. panicii* 8,81% (v/w) и *A. absinthium* 10,15% (v/w).
 7. Антиоксидативни капацитет метанолних екстраката одабраних биљних врста је опадао следећим редом: *Achillea crithmifolia* > *Achillea grandifolia* > *Hyssopus officinalis* > *Artemisia absinthium* > *Tanacetum parthenium* > *Laserpitium latifolium* > *Angelica panicii* > *Angelica sylvestris*. Метанолни екстракт биљне врсте *A. crithmifolia* је имао највећи садржај полифенола (172,95 mg GA/g сувог екстракта) и флавоноида (97,70 mg RE/g сувог

екстракта) и показао је најбољи антиоксидативни капацитет у DPPH (91,40 %) и ABTS (0,59 mmol TE/g сувог екстракта) методама.

За метанолне екстракте одабраних биљних врста минималне инхибиторне концентрације (MIC) су се кретале у опсегу концентрација од 6,25 mg/mL (деловање екстракта *L. latifolium* против *S. pyogenes* из бриса ране, што представља најбољи резултат) до 100,00 mg/mL (деловање екстракта *A. panicicii*, *A. sylvestris* и *H. officinalis* против *Acinetobacter* sp. из бриса ране), као и активност екстракта *H. officinalis* против *P. mirabilis* из бриса ране, *E. coli* из бриса грла и аспират и *P. aeruginosa* (2) из спутума. Минималне бактерицидне концентрације (MBC) су се кретале у опсегу концентрација од 12,50 mg/mL (активност екстракта *T. parthenium* против *S. pyogenes* из бриса ране) до 100,00 mg/mL. Најјачу активност су имали екстракти биљних врста *A. crithmifolia* и *T. parthenium* са инхибиторним/бактерицидним ефектом у опсегу концентрација од 12,50-100,00 mg/mL против свих тестираних сојева (са изузетком соја *Klebsiella* sp. изолованог из ране). Сви испитивани екстракти су имали инхибиторно/бактерицидни ефекат једино против соја *P. mirabilis* из бриса ране.

8. Синергистички ефекат: На основу добијених резултата одабрана су најактивнија етарска уља биљних врста *A. sylvestris* и *A. panicicii* и антибиотик са најслабијим деловањем, еритромицин и испитивано је њихово синергистичко деловање. Код свих тестираних бактеријских сојева је забележен синергизам појединачних етарских уља *A. sylvestris* и *A. panicicii* и еритромицина тј. уља су значајније смањила минималне инхибиторне концентрације (MIC) вредности за еритромицин.
9. У овој дисертацији су презентовани нови подаци о антиоксидативној активности етарских уља биљних врста *A. sylvestris*, *A. panicicii*, *L. latifolium*, *A. crithmifolia* и *T. parthenium*, као и метанолних екстракта *A. panicicii*, *A. sylvestris*, *A. grandifolia*, *A. crithmifolia* и *H. officinalis*. Такође, нови су и подаци о антибактеријској активности етарских уља биљних врста *A. sylvestris*, *A. panicicii* и *A. grandifolia*, као и метанолних екстракта биљних врста *A. panicicii*, *A. grandifolia*, *L. latifolium* и *T. parthenium*. Нису пронађени подаци ни о синергистичком деловању испитиваних уља и антибиотика. За све испитиване биљне врсте у овој дисертацији су презентовани први

резултати о њиховој антимикубној активности против мултирезистентних изолата из пацијената. Генерално, с обзиром да су истраживања вршена на високо мултирезистентним сојевима бактерија, испитиване биљне врсте поседују значајан антимикубни потенцијал и могу бити потентан природни извор биоактивних једињења. Будућа истраживања би требало осмислити у правцу испитивања чистих доминантних компоненти и утврђивања њиховог синергистичког деловања са антибиотцима, у циљу тражења нових антимикубних агенаса и превазилажења проблема мултирезистентности патогених бактерија.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Adams R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry, 4th edition. Carol Stream: Allured Publishing Corporation.
- Albayrak S. 2013. The Volatile Compounds and Bioactivity of *Achillea sieheana* Stapf. (Asteraceae). *Iran J Pharm. Res*, 12: 37-45.
- Alinezhad H., Azimi R., Zare M., Ebrahimzadeh M.A., Eslami S., Nabavi S.F., Nabavi S.M. 2013. Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves, and stems of *Hyssopus officinalis* L. var. *angustifolius*. *Int J Food Prop*, 16:1169-1178
- Alizadeh A., Alizadeh O., Sharafzadeh S.H., Mansoori S. 2011. Effect of different ecological environments on growth and active substances of garden thyme. *Adv. Envir. Bio*, 5: 780-783.
- Amyes S.G. 2007. "Enterococci and streptococci". *Int. J. Antimicrob. Agents*, 29 (3): S43–52.
- Andersson D.I., Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Rev Microbiol*, 8:260-271.
- Asenov I. 1982. *Laserpitium* L. In: Flora Republicae Popularis Bulgaricae Vol. 7, Kožuharov (Ed.), In Aedibus Academiae Scientiarum Bulgaricae, Serdicae, 258-266.
- Asenov I., Gusev C., Kitanov G., Nikolov S., Petkov T. 1998. Bilkosabiranje – rakovodstvo za brane i parvična prerabotka na lečebni rastenja. Sofia: Biler, 367.
- Aydin S., Ozturk Y., Beis R., Baser K.H.C. 1996. Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* Essential Oils for Analgesic Activity. *Phytotherapy Research*, 10: 342-344.
- Bajaksouzian S., Visalli M.A., Jacobs M.R., Appelbaum P.C. 1997. Activities of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with amikacin, against acinetobacters as determined by checkerboard and time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother*, 41: 1073-1076.
- Bajpai V.K., Baek K.H., Kang S.C. 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45: 722- 734.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. *Food Chem. Toxicol*, 46: 446-475.

- Balasundram, N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plant and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 99: 191-203.
- Barton S.D., Nakanishi K, Meth-Cohn O. 1999. Comprehensive natural products chemistry. Elsevier Science Ltd, London.
- Bassolé I.H., Lamien-Meda A., Bayala B. 2010. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*. 5(11):7825–39.
- Bassolé I.H.N., Juliani H.R. 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17: 3989-4006.
- Baykan Erel Ş., Gottfried R., Serdar GŞ., Nefise Ü.K.Y., Sibel K., Ahmet U.Z. 2012. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. *Turk J Biol*, 36: 75-84.
- Berger-Jekić O., Jovanović K.M., Kocić B., Kulauzov M., Nedeljković R.M., Otašević M., Pecić J., Švabić-Vlahović M. 1997. Specijalna bakteriologija. IŠP „Savremena administracija“ D.D. Beograd.
- Bigović D.J. 2013. Karakterizacija suvih ekstrakata cvasti smilja, *Helichrysum plicatum* DC. i ispitivanje njihove antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd,
- Biswajit B., Gautam K.R.K., Shibendu B. 2012. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. *I. Res. J. Biological Sci*, 1: 65-71.
- Blagojević P., Radulović N., Palić R., Stojanović G. 2006. Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *J Agric Food Chem*, 54: 4780-9.
- Blois M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199–1200.
- Bošković M., Baltić Ž. M., Ivanović J., Đurić J., Lončina J., Dokmanović M., Marković R. 2013. Use of essential oils in order to prevent foodborne illnesses caused by pathogens in meat. *Tehnologija mesa*, 54 (1-2): 14-20.
- Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apitone. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(10):3357-60.

- Britton G. 1983. The biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Brković L.D., Čomić Lj., Solujić-Sukdolak S., 2006. Antibacterial activity of some plants from family Apiaceae in relation to selected phytopathogenic bacteria. *Kragujevac J. Sci*, 28: 65-72.
- Bubonja - Šonje M., Abram M. 2014. Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. *Medicina Fluminensis*, 50(2): 128-149.
- Buitrago D., Velasco J., Díaz T., Morales A. 2012. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Monticalia Imbricatifolia* Schultz (Asteraceae). *Rev. Latinoamer. Quím*, 40(1):13-18.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J Food Microbiol*, 94: 223-53.
- Cal K. 2006. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Med*, 72: 311-316.
- Chang Y.Y., Yang D.J., Chiu C.H., Lin Y.L., Chen J.W., Chen Y.C. 2013. Antioxidative and antiinflammatory effects of poly-phenol-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) - flower water extract on livers of high fat diet fed hamsters. *J Funct Food*, 5:44-53.
- Changqing W., Feng C., Xi W., Hyun-Jin K., Guo-qing He., Haley-Zitlin V., Huang G. 2006. Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. *Food Chem*, 96:220–227.
- Chehregani A., Hajsadeghian S., Amiri H. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Tanacetum parthenium* and *T. polycephalum* from Iran. *Planta Med*. 75 - PI30. DOI: 10.1055/s-0029-1234794.
- Chen J.H., Ho C.T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid. *J Agric Food Chem*, 45:2374–2378.
- Chialva F., Liddle P.A.P., Doglia G. 1983. Chemotaxonomy of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) I. Composition of the essential oil of several chemotypes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 176: 363–366.
- Chou S.T., Peng H.Y., Hsu J.C., Lin C.C., Shih Y. 2013. *Achillea millefolium* L. Essential Oil Inhibits LPS-Induced Oxidative Stress and Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Macrophages. *Int J Mol Sci*, 14: 12978-93.

- Chou T.C., Talalay P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22: 27-55.
- Chow J.W., Thal L.A., Perri M.B., Vazquez J.A., Donabedian S.M., Clewell D.B., Zervos M.J., 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, 37 (11): 2474–7.
- Clevenger J.P. 1928. Content of essential oil in plants. *Amer. Perfumer and Essential Oil Rev*, 23: 467-503.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19. Wayne, PA, USA.
- Cos P., Arnold J.V., Dirk V.B., Louis M. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol*, 106:290–302
- Courvalin P. 2006. "Vancomycin resistance in Gram-positive cocci". *Clin. Infect. Dis*, 42 (1): 25–34.
- Coutinho H.D.M., Matias E.F.F., Santos K.K.A., Tintino S.R., Souza C.E.S., Guedes G.M.M., Santos F.A.D., Costa J.G.M., Falcão-Silva V.S., Siqueira-Júnior J.P. 2010. Enhancement of the Norfloxacin Antibiotic Activity by Gaseous Contact with the Essential Oil of *Croton zehntneri*. *J. Young Pharm*, 2: 362-364.
- Coutinho H.D.M., Falcão-Silva V.S., Siqueira-Júnior J.P., Costa J.G.M. 2010. Use of aromatherapy associated with antibiotic therapy: modulation of the antibiotic activity by the essential oil of *Zanthoxylum articulatum* using gaseous contact. *J Essent Oil Bear-Pl*, 13:670–5.
- Coutinho H.D.M., Rodrigues F.F.G., Nascimento E.M.M., Costa J.G.M., Falcão-Silva V.S., Siqueira-Júnior J.P. 2011. Synergism of gentamicin and norfloxacin with the volatile compounds of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae). *J Essent Oil Res*, 23:24–8.
- Чанчаревић А., Бугарски Б., Шавикин К., Здунић Г. 2013. Биолошка активност врста *Thymus vulgaris* и *Thymus serpyllum* и њихово коришћење у етномедицини. *LEK. SIROV*, XXXIII (33), 3 – 17. UDC: 615.32:582.929.4
- Daglia M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*, 23(2):174-81.
- Dai J., Zhu L., Yang L., Qiu J., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia Prostrata*. *EXCLI Journal*, 12: 479-490 .

- Dehghanzadeh N., Ketabchi S., Alizadeh A. 2012. Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Hyssopus officinalis* L. grown in Iran. *Asian J. Exp. Biol. Sci*, 3: 767-771.
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol*, 74: 101–109
- Delgado F., Carvalho R. R., Nogueira A. C., Mattos A.P., Figuierdo L. H., Oliveira S. H., Chahoud I., Paumgartten F. J. 1996. Study on embryo-foetotoxicity of β -myrcene in the rat. *Food Chem. Toxicol*, 31: 31-35
- Della Loggia R. (2000). Pharmacology of medicinal plants. Proceeding of the I Conference on medicinal and aromatic plants of Southeast european countries and IV meeting „ Days of medicinal plants 2000“. Arandelovac, Serbia: 11-14
- De Smet P.A.G.M. 1997. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in health care. *Drugs*, 54:801-840.
- Dixon R.A., Paiva N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085-1097.
- Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.M., Nabavi S.F., Bahramian F., Bekhradnia A.R. 2010. Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C.speciosum*. *Pak J Pharm Sci*, 23:29-34
- Evergetis E., Michaelakis A., Haroutounian S.A. 2012. Essential Oils of Umbelliferae (Apiaceae) Family Taxa as Emerging Potent Agents for Mosquito Control, Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics, Dr. Sonia Soloneski (Ed.), ISBN: 978-953-51-0050-8, InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/integrated-pest-management-and-pestcontrol-current-and-future-tactics/essential-oils-of-umbelliferae-apiaceae-family-taxa-as-emerging-potentagents-for-mosquito-control>.
- Espina L., Gelaw T.K., de Lamo-Castellví S., Paga'n R., Garcí'a-Gonzalo D. 2013. Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes. *PLoS ONE*, 8(2): e56769.
- Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett. Appl. Microbiol*, 36: 35–40.

- Fogaça R.T.H., Cavalcante A.D.A., Serpa A.K.L., Sousa P.J.C., Coelho-de-Souza A.N., Leal-Cardoso J.H. 1997. The effects of essential oil of *Mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. *Phytotherapy Research*, 11: 552.
- Fraternali D., Flamini G., Ricci D. 2014. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Angelica archangelica* L. (Apiaceae) Roots. *Journal of medicinal food*, 17(9): 1043-1047.
- Fridkin S.K. 2001. Increasing prevalence of antimicrobial resistance in intensive care units. *Crit Care Med*, 29: N64-68.
- Galambosi B., Svoboda K.P., Hampson J.B., Asakawa Y. 1999. Agronomical and phytochemical investigation of *Pycnanthemum* spp. in Finland. *Z. Arzn. Gew.Pfl*, 4: 19-23.
- Gallucci N., Oliva M., Carezzano E., Zygadlo J., Demo M. 2010. Terpenes antimicrobial activity against slime producing and non-producing staphylococci. *Molecular Medicinal Chemistry*, 21: 132-136.
- Gallucci N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygadlo J., Demo M. 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Frag J*, 24(6): 348-354.
- Gerner-Smidt P. 1992. "Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex". *Journal of Clinical Microbiology*, 30(10): 2680-5.
- Grassmann J. 2005. Terpenoids as Plant Antioxidants. *VITAMINS & HORMONES*, 72:505-35.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26(2): 142-150.
- Haider F. 2007. Essential oil constituents of *Tanacetum parthenium* L during different growth periods at monsoon conditions of subtropical North Indian plants. *Essential Oil Res*, 21: 251-253.
- Haminiuk C.W.I., Maciel G.M., Plata-Oviedo M.S.V., Peralata R.M. 2012. Phenolic compounds in fruits-an overview. *Int J Food Sci Techol*, 47: 2023-44
- Harborne J.B. 1994. The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman & Hall, Cambridge, UK.

- Helander I.M., Alakomi H.L., Latva K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem*, 46:3590–3595.
- Heritage J., M'Zali F.H., Gascoyne-Binzi D., Hawkey P.M. 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 44: 309-18.
- Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., Horan T.C., Sievert D.M., Pollock D.A., Fridkin S.K. 2008. "NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007". *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29 (11): 996–1011.
- Himejima M., Kubo I. 1993. Fungicidal activity of polygodial in combination with anethole and indole against *Candida albicans*. *J. Agricultur Food Sci*, 41: 1776.
- Huycke M.M., Spiegel C.A., Gilmore M.S. 1991. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35 (8):1626-34.
- Ike Y., Hashimoto H., Clewell D.B. 1984. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect Immun*, 45(2): 528–30.
- Ilić B.S., Kocić B.D., Ćirić V.M., Cvetković O.G., Miladinović D.L. 2014. An In Vitro Synergistic Interaction of Combinations of *Thymus glabrescens* Essential Oil and Its Main Constituents with Chloramphenicol. *The Scientific World Journal*. 2014 (2014): 12
- Inoue Y., Shiraishi A., Hada T., Hirose K., Hamashima H., Shimada J. 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol Lett*, 237 (2): 325–331.
- Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., Tuylu B.A., Kurkcuoglu M., Baser K.H.C. 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. *Food Chem*, 93: 551 –556.
- Irshad M., Habib-Ur-Rehman Shadid M., Shadid A., Ghous T. 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Phytotoxic Activities of Essential Oil of *Angelica glauca*. *Asian Journal of Chemistry*, 23 (5): 1947-1951.

- Izadi Z., Esna-Ashari M., Piri K., Davoodi P. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of feverfew (*Tanacetum parthenium*) essential oil. *Int. J. Agric. Biol.*, 12: 759–763.
- Izadi Z., Aghaalikhani M., Esna-Ashari M., Davoodi P. 2013. Determining Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) Essential Oil on some Microbial Strains. *Zahedan J Res Med Sci*, 15: 8-13.
- Јанчић Р, Стошић Д, Мимица-Дукић М, Лакушић Б. 1995. Ароматичне биљке Србије. Београд, Горњи Милановац: НИП Дечје Новине, 296.
- Јанчић Р. 2002. Ботаника фармацеутика. Београд: Службени лист СРЈ.
- Janssen A.M., Scheffer J.J.C., Baerheim Svendsen A. 1987. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976– 1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica*, 53:396–398.
- Jones R.N. 2001. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest*, 119: 397S-404S.
- Јосифовић М. (ед.) (1970-1977): Флора СР Србије 1-9. – Српска академија наука и уметности, Београд.
- Judzientiene A., Budiene J., Giricyte R., Masotti V., Laffont-Schwob I. 2012. Toxic Activity and Chemical Composition of Lithuanian Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Essential Oils. *Rec. Nat. Prod*, 6:180-183.
- Juteau F., Jerkovic I., Masotti V., Milos M., Mastelic J., Bessiere J.M., Viano J. 2003. Composition and antimicrobial activity of the Essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Med*, 69:158-161.
- Karaalp C., Ayse N.Y., Ulku Karabay Yavasoglu N. 2009. Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea* L. flower head extracts. *Pharm Biol*, 47:86–91.
- Каракашевић Б. 1987. Пето издање. Микробиологија и паразитологија. Београд-Загреб: Медицинска књига.
- Kavanaugh N.K., Ribbeck K. 2012. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 78(11):4057-61.
- Keville K. 1996. Herbs for health and healing. Emmaus, PA: Rodale Press; 36.
- Kizil S., Haşimi N., Tolan V., Kiliç E., Karataş H. 2010. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Essential Oil. *Not. Bot. Hort. Agrobot Cluj*, 38: 99-103.

- Китић Д. 2006. Дивљи босиљак, хемијско и микробиолошко испитивање, Задужбина Андрејевић, Београд.
- Kochan E., Wysokinska H., Chmiel A., Grabias B. 1999. Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*. *Biosciences*, 54:11-16.
- Winn W.C., Koneman E.W. 2006. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Konyalioglu S., Karamenderes C. 2004. Screening of total flavonoid, phenol contents and antioxidant capacities of some *Achillea* L. species growing in Turkey. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 46:163-170.
- Ковачевић Н. 2004. Основи фармакогнозије. Треће издање. Београд: Српска школска књига.
- Krist S., Sato K., Glasl S., Hoefler M., Saukel J. 2008. Antimicrobial effect of vapours of terpineol, (R)-(-)-linalool, carvacrol, (S)-(-)- perillaldehyde and 1,8-cineole on airborne microbes using a room diffuser. *Flavour Frag. J*, 23: 353-356.
- Lambert P.A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*, 95: 22-26.
- Landman D., Quale J.M., Mayorga D., Adedeji, A., Vangala K., Ravishankar J., Flores C., Brooks S. 2002. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med*, 162: 1515-1520.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Jiang Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem*, 102:771-776.
- Ludmila H., Viera C. 2005. Antiradical activity and the reduction power of herbal extracts and their phenolic acids. *Bulletin Potravinarskeho Vyskumu*, 44:237-247.
- Lv F., Liang H., Yuan Q., Li C. 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44: 3057- 3064.
- Magi G., Marini E., Facinelli B. 2015. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Front. Microbiol.* | <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00165>.

- Magwa M.L., Gundidza M., Gwerua N., Humphrey G., 2006. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 85-89.
- Mahboubi M., Haghi G., Kazempour N. 2011. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Hyssopus officinalis* L. Essential oil. *J Biol. Active Prod. Nat*, 1: 132-137.
- Mahboobi M., Shahcheraghi F., Feizabad M.M. 2006. Bactericidal effects of essential oils from clove, lavender and geranium on multi-drug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran. J. Biotechnol*, 4: 137–140.
- Maragakis L.L., Perl T.M. 2007. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. *Oxford Journals*, 46: 1254-1263.
- Марин П.Д. 2003. Биохемијска и молекуларна систематика биљака. ННК интернационал, Београд.
- Martinez J.L., Baquer F. 2000. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*, 44: 1771-1777.
- Matasyoha J.C., Kiplimo J.J., Karubiub N.M., Hailstorks T.P. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Satureja biflora* (Lamiaceae), *B. Chem. Soc. Ethiopia*, 21: 249–254.
- Матејић Ј. 2013. Биолошка активност етарских уља и екстракта одабраних биљних врста из фамилије Ариасеае. докторска дисертација; Универзитет у Београду, Биолошки факултет, Београд
- Mazzanti G., Battinelli L., Salvatore G. 1998. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour Frag J*, 13: 289-294.
- McDonnell G., Denver-Russell A. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* 12:147-179.
- Mihajilov-Krstev T., Jovanović B., Jović J., Ilić B., Miladinović D., Matejić J., Rajković J., Đorđević Lj., Cvetković V., Zlatković B. 2014. Antimicrobial, Antioxidative, and Insect Repellent Effects of *Artemisia absinthium* Essential Oil. *Planta Med.* 80: 1698–1705.
- Миладиновић Б. 2015. Потенцијална употреба сокова и екстракта биљних сорти црне рибизле (*Ribes nigrum* L.) као функционалне хране. докторска дисертација; Универзитет у Нишу, Медицински факултет.
- Miller N., Rice-Evans C. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radic Res.* 26: 195–199.

- Mitić V., Đorđević S. 2000. Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Serbia. *Facta Universitatis. Series: Physics, Chem. Technol.* 2: 105-108.
- Mitić V., Stankov-Jovanović V., Djordjević A., Ilić M., Simonović S., Stojanović G. 2015. Chemical Composition of the Essential oil of *Laserpitium latifolium* from Serbia. *Nat Prod Commun*, 10: 1-3.
- Mitić V.D., Stankov-Jovanović V.P., Jovanović O.P., Palić I.R., Djordjević A.S., Stojanović G.S. 2011. Composition and antioxidant activity of hydrodistilled essential oil of Serbian *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber ssp. *chia* (Schreber) Arcangeli. *JEOR*, 23:70-74.
- Mohsenzadeh F., Chehregani A., Amiri H. 2011. Chemical composition, antibacterial activity and cytotoxicity of essential oils of *Tanacetum parthenium* in different developmental stages. *Pharm. Biol.* 49: 920-6.
- Murakami Y., Omoto T., Asai I., Shimomura K., Yoshihira K., Ishimaru K. 1998. Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 53:75-78.
- Murray B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*, 3(1): 46–65.
- Naczek M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*. 1054(1-2): 95-111.
- Nester E.W., Anderson D.G., Roberts C.E., Pearsall N.N., Nester M.T. 2004. Microbiology a human perspective. Fourth edition. ISBN: 0072919248
- Nikaido H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 264: 382–388.
- NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance). 2003. System Report, data summary from January 1992 through June 2003. *Am J Infect Control*, 31: 481-498.
- Obidi O.F., Adelowotan A.O., Ayoola G.A., Johnson O.O., Hassan M.O., Nwachukwu, S.C.U., 2013. Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. *The International Journal of Biotechnology*, 2(6):113-122.
- Orav A., Raal A., Arak E., Müürisepp M., Kailas T. 2006. Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem*, 55: 155–165.
- O'Shea M.K. 2012. *Acinetobacter* in modern warfare. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39 (5): 363–75.

- Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.P., Begin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int J Food Microbiol*, 37:155–62.
- Ozek T., Ozek G., Baser K.H.C., Duran A. 2008. Composition of the essential oils of *Angelica sylvestris* L. var. *syvestris* isolated from the fruits by different isolation techniques. *Journal of Essential Oil Research*, 20: 408-411.
- Ozer H., Sokmen M., Gulluce M., Adiguzel A., Kilic H., Sahin F., Baris O. 2006. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of *Hyssopus officinalis* L ssp. *angustifolius*. *Ital J Food Sci*, 18:73-84.
- Palić R., Stojanović G., Nasković T., Randelović N. 2003. Composition and Antibacterial Activity of *Achillea crithmifolia* and *Achillea nobilis* Essential Oils. *J. Essent. Oil Res*, 15: 434-437.
- Panigrahy B., Grumbles L.C., Millar D., Naqi S.A., Hall C.F. 1979. Antibiotic-induced immunosuppression and Levamisole-induced immunopotentiality in Turkey. *Avian Diseases*, 23:401-408.
- Pareek A., Suthar M., Rathore GS., Bansal V. 2011. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacogn Rev*, 5:103-110.
- Pavlović M., Petrović S., Milenković M., Kukić J., Couladis M., Tzakou O., Niketić M. 2008. Composition and antiradical capacity of *Achillea grandifolia* essential oil from Serbia. *Planta Med*, 74 - PI12.
- Петровић-Цековић Ј. 2004. Антибактеријска својства изабраних ароматичних и лековитих биљака из фамилије Lamiaceae. магистарска теза. Униерзитет у Крагујевцу. Природно математички факултет.
- Polatoglu K., Demirci F., Demirci B., Gören N., Başer K.H. 2010. Antibacterial activity and the variation of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. essential oils from Turkey. *J Oleo Sci*, 59: 177-84.
- Popović V., Petrović S., Milenković M., Drobaca M., Couladis M., Niketić M. 2015. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Laserpitium latifolium* L. and *L. ochridanum* Micevski (Apiaceae). *Chem. Biodivers*, 12: 170-177.
- Popović V., Heyerick A., Petrović S., van Calenbergh S., Karalić I., Niketić M., Deforce D. 2013. Cytotoxic activity of *Laserpitium latifolium* L. extract and its daucane and phenylpropanoid constituents. *Rec Nat Prod*, 7:245-249.

- Proestos C., Chorianopoulos N., Nichas G.J.E., Komaitis M. 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J Agric Food Chem*, 53:1190–1195.
- Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K.M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 494-507.
- Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Alakomi H.L., Oksman-Caldentey K.M. 2005. The action berry phenolics against human intestinal pathogens. *Biofactors*, 23: 243-51.
- Radulović N.S., Randjelović P.J., Stojanović N.M., Blagojević P.D., Stojanović-Radić Z.Z., Ilić I.R., Djordjević V.B. 2013. Toxic essential oils. Part II: chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. *Food Chem Toxicol*, 58: 37-49.
- Radulović N.S., Blagojević P.D., Skropeta D., Zarubica A.R., Zlatković B.K., Palić R.M. 2010. Misidentification of Tansy, *Tanacetum macrophyllum*, as Yarrow, *Achillea grandifolia*: a Health Risk or Benefit? *Nat Prod Commun*, 5: 121-127.
- Rajesh K.J. 2013. Volatile composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing in Western Ghats region of North West Karnataka, India. *Pharm. Biol*, 51: 888-892.
- Rateb M.E.M., El-Gendy A.N.A.M., El-Hawary S.S., El-Shamy A.M. 2007. Phytochemical and biological investigation of *Tanacetum parthenium* (L.) cultivated in Egypt. *J. Med. Plants Res*, 1: 018-026.
- Ratledge C., Wilkinson S.G. 1988. An overview of microbial lipids. In: Ratledge C., Wilkinson SG. (Eds.). *Microbial lipids*, vol. 1. Academic Press, London, 3–22.
- Rezaeinodehi A., Khangholi S. 2008. Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* Growing Wild in Iran. *PJBS*, 11: 946-949.
- Risipail N, Morris P., Webb J.K. 2005. Phenolic compounds: extraction and analysis. *Lotus Japonicus Handbook* 7: 349–355.
- Rodrigues F.F.G., Costa J.G.M., Coutinho H.D.M. 2009. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*, 16:1052–5.
- Rodrigues F.F.G, Costa J.G.M., Coutinho H.D.M. 2010. Enhancement of the antibiotic activity of gentamicin by volatile compounds of *Zanthoxylum articulatum*. *Indian J Med Res*, 131:833–5.

- Roh J., Shin S. 2014. Antifungal and Antioxidant Activities of the Essential Oil from *Angelica koreana* Nakai. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014 (98503): 7.
- Ryan K.J., Ray C.G. 2004. Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9, 294—5.
- Sakurai T., Kitadate K., Nishioka H., Fuji H., Kizaki T., Kondoh Y., Izawa T., Ishida H., Radak Z., Ohno H. 2010. Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. *J Nutr Biochem*, 21: 47-54.
- Santos N.K.A., Coutinho H.D.M., Viana G.S.B., Rodrigues F.F.G., Costa J.G.M. 2011. Chemical characterization and synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. *Med Chem Res*, 20:637–41.
- Сарић М. 1989. Лековите биљке Србије. Српска академија наука и уметности. Специјално издање DXCVIII. Одељење за математику и природне науке, 65: 1-640.
- Sarker S.D., Eynon E., Fok K., Kumarasamy Y., Murphy E.M., Nahar L., Shaeen E.M., Shaw N.M., Siakalima, M. 2003. Screening the extracts of the seeds of *Angelica millefolium*, *Angelica sylvestris* and *Phleum pretense* for antibacterial, antioxidant activities and general toxicity. *Oriental pharmacy and Experimental medicine*, 3 (3): 157-162.
- Sarker S.D., Nahar L., Rahman M.M., Siakalima M., Middleton M., Byres M., Kumarasamy Y., Murphy E. 2005. Bioactivity of umbelliprenin, the major component found in the seeds of *Angelica sylvestris*. *Ars Pharmaceutica*, 46(1): 35-41.
- Schlutzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell*, 102 (5): 615–23.
- Sengul M., Ercisli S., Yildizb H., Gungor N., Kavaz A., Çetin B. 2011. Antioxidant, antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of *Artemisia absinthum*, *Artemisia santonicum* and *Saponaria officinalis*. *Iran J Pharm Res*, 10:49-56.
- Shinwari Z.K., Khan I., Naz S., Hussain A. 2009. Assessment of antibacterial activity of three plants used in Pakistan to cure respiratory diseases. *Afr J Biotechnol*, 8:7082-7086.
- Sibanda S., Chigwada G., Poole M., Gwebu E.T., Noletto J.A., Schmidt J.M., Rea A.I., Setzer W.N. 2004. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *J. Ethnopharmacol*, 92: 107–111.

- Siegel J.D., Rhinehart E., Jackson M., Chiarello L., 2006. Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings. Department of health and human service, USA.
- Simonović S.R., Stankov-Jovanović V.P., Mitić V.D., Ilić M.D., Petrović G.M., Stojanović G.S. 2014. Chemical composition of *Angelica pancicii* essential oil determined by liquid and headspace GC-MS techniques. *Nat Prod Commun*, 9(2): 271-2.
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 2004. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and α -toxin by *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol*, 53: 1023-1027.
- Singh R., Verma P.K., Singh G. 2012. Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *J Intercult Ethnopharmacol*, 1:101-104.
- Sivastava J., Lambart J., Vietmeyer N. 1996. Medicinal plants, an expanding role in development. *Word bank technical paper*, 320.
- Skala D., Žižović I., Petrović S.S. 1999. Etarska ulja - Destilacija, ekstrakcija, izbor tehnologije i kvalitet. *Hemijska industrija*, 4-5: 123-138.
- Sokolova S.M., Buzuk G.N., Lovkova M.Y., and Tyutekin Y.V. 2005. Membranotropic compounds and alkaloid accumulation in plants. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 402(1-6): 220-222.
- Soković M., Glamočlija J., Marin P.D., Brkić D., van Griensven, L.J.L.D. 2010. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. *Molecules*, 15: 7532-7546.
- Stanković N., Čomić Lj., Kocić B., Nikolić D., Mihajilov-Krstev T., Ilić B., Miladinović D. 2011. Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije. *Hem. Ind*, 65(5): 583-589.
- Stanković N., Mihajilov-Krstev T., Zlatković B., Stankov-Jovanović V., Mitić V., Jović J., Čomić Lj., Kocić B., Bernstein N. (2015). Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula. *NJAS-WAGEN J LIFE SC*. DOI:10.1016/j.njas.2015.12.006
- Stanković N., Mihajilov-Krstev T., Zlatković B., Matejić J., Stankov-Jovanović V., Kocić B., Čomić Lj. (2016). Comparative Study of Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Selected Aromatic Plants from Balkan Peninsula. *Planta Med*. DOI: 10.1055/s-0042-101942.
- Stevanović B. 1995. The practical importance of preserving the diversity of flora in Yugoslavia. In: Stevanović V, Vasić V. (eds.). Biodiversity of Yugoslavia with an overview

of species of international importance. Belgrade: Ecolibri, Faculty of Biology, Belgrade; 243-258.

- Stojanović G., Stojanović I., Stankov-Jovanović V., Mitić V., Kostić D. 2010. Reducing power and radical scavenging activity of four *Parmeliaceae* species. *Cent Eur J Biol*, 5:808-813.
- Strack D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey PM., Harborne JB (Eds.), *Plant biochemistry*. Academic Press, New York, 387–437.
- Stuart CH., Schwartz S.A., Beeson T.J., Owatz C.B. 2006. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod*, 32:93–98.
- Suleimenov Ye.M., Atazhanov G.A., Ozek T., Demirci B., Kulyyasov A.T., Adekenov S.M., Baser K.H.C. 2001. Essential oil composition of three species of *Achillea* from Kazakhstan. *Chem. Nat. Compd*, 37: 447-450.
- Тасић, С., Фодуловић, Ш.К., Менковић, Н. (2004) Водич кроз свет лековитог биља. Ваљево: Ваљевац: 202.
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., Donnel C.P.O., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Chem*, 57: 5987–6000.
- Tkachenko K.G., Platonov V.G., Satsyperova I.F. 1995. Anti-virus and anti-bacterial activity of ethereal oils from fruits of species of the genus *Heracleum* L. (Apiaceae) *Rastitel'nye Resursy*, 31: 9-19.
- Tomani J.C., Murangwa C., Bajyana S., Mukazayire M.J., Ingabire M.G., Chalchat J.C. 2014. Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Pinus patula* growing in Rwanda. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*, 2(3): 55-59.
- Тописировић Љ., Јовчић Б. 2013. Антибиотици-молекуларни механизми деловања и резистенције. Београд: Биолошки факултет, Универзитет у Београду.
- Touré D., Kouamé P., Bedi G., Djaman A.J., Guesssennd N., Oussou R., Dinzedi R., Chalchat J., Dosso M., Tonzibo F. 2014. Terpenes, Antibacterial and Modulatory Antibiotic Activity of Essential Oils from *Croton hirtus* L' Hér. (Euphorbiaceae) from Ivory Coast. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(4): 607-616.
- Tsuruga M., Nakajima H., Magae J. 2007. Immunosuppressive activity of 4-O-Methylascochlorin. *The Journal of Antibiotics*, 60: 20–26.
- Туцаков Ј. 1997. Фитотерапија. VII издање. Београд: Рад; 717.

- Tzakou O., Skaltsa H., Harvala C. 1996. Flavonoids from *Achillea crithmifolia* Waldst. and Kit. *Sci Pharm*, 64:197-202.
- Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev*, 56(3): 395– 411.
- Vandendool H., Kratz P.D. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr*, 11:463-71.
- van Vuuren S.F., Viljoen A.M. 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6): 540 - 544.
- Varga E., Hajdu Z., Veres K., Mathe I., Nemeth E., Pluhar Z., Bernath J. 1998. Production biology and chemical variants of *Hyssopus officinalis*. *Acta Pharm Hung*, 68:183-188.
- Veras H.N.H., Rodrigues F.F.G., Colares A.W., Menezes I.R.A., Coutinho H.D.M., Botelho M.A, Costa J.G.M. 2012. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia*, 83(3), 508–512.
- Vimal M., Vijaya P.P., Mumtaj P., Seema Farhath M.S. 2013. Antibacterial activity of selected compounds of essential oils from indigenous plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(1): 248-253.
- Vinokurova E.Yu., Shults E.E., Bagryanskaya I.Yu., Gatilov Yu.V., Tolstikov G.A. 1999. (+) - Globulol as a new sesquiterpene alcohol from *Angelica sylvestris* L. Russian Chemical Bulletin, 48(3): 600-603.
- Voet D., Voet J.G. 2004. Biochemistry. 3rd edition. Wiley
- Voon H.C., Bhat R., Gulam R. 2012. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 34-55.
- Wang N., Yang X. 2010. Two new flavonoid glycosides from the whole herbs of *Hyssopus officinalis*. *J Asian Nat Prod Res*. 12:1044-1050.
- Weisglass H. 1989. Medicinska bakteriologija. Drugo izdanje. Zagreb: Jugoslovenska medicinska naklada.
- Wyles D.L., Kaihara K.A., Vaida F., Schooley R.T. 2007. Synergy of small molecular inhibitors of hepatitis C virus replication directed at multiple viral targets. *J.Virol*. 81(6): 3005-8.
- Wong S.P., Lai P.L., Jen H.W.K. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem*, 99:775-783.

- Wu C., Chen F., Wang X., Kim H.J., He G.Q., Haley-Zitlin V., Huang G. 2006. Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. *Food Chem*, 96: 220–227.
- Xianfei X., Xiaoqiang C., Shunying Z., Guolin Z. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. *Food Chem*, 100: 1312–1315.
- Zenati F., Benbelaid F., Khadir A., Bellahsene C., Bendahou M. 2014. Antimicrobial effects of three essential oils on multidrug resistant bacteria responsible for urinary infections. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4 (11): 015-018.
- Zengin H., Baysal A.H., 2014. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules*, 19: 17773-17798.
- Zgorka G., Głowniak K. 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J Pharm Biomed Analysis*, 26:79-87.

8. ПРИЛОЗИ

8.1. Прилог I - Stanković, N., Mihajlov-Krstev, T., Zlatković, B., Matejić, J., Stankov-Jovanović, V., Kocić, B., Čomić, Lj. (2016). Comparative Study of Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Selected Aromatic Plants from Balkan Peninsula. *Planta Med.* DOI: 10.1055/s-0042-101942

8.2. Прилог II - Stanković, N., Mihajlov-Krstev, T., Zlatković, B., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V., Jović, J., Čomić, Lj., Kocić, B., Bernstein, N. (2016). Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula. *NJAS-WAGEN J LIFE SC.* DOI:10.1016/j.njas.2015.12.006

8.3. Прилог III - Stanković, N., Čomić, Lj., Kocić, B., Nikolić, D., Mihajlov-Krstev, T., Ilić, B., & Miladinović, D. (2011). Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije. *Hem. Ind.* 65 (5), 583–589

8.4. Прилог IV - Хроматограми са приказаним квалитативним и квантитативним хемијским саставом изолованих уља

Comparative Study of Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Selected Aromatic Plants from Balkan Peninsula

Authors

Nemanja Stanković¹, Tatjana Mihajilov-Krstev², Bojan Zlatković², Jelena Matejić³, Vesna Stankov Jovanović², Branislava Kocić³, Ljiljana Čomić⁴

Affiliations

¹ Institute for Public Health, Niš, Serbia

² University of Niš, Faculty of Science and Mathematics, Niš, Serbia

³ University of Niš, Faculty of Medicine, Niš, Serbia

⁴ University of Kragujevac, Faculty of Science and Mathematics, Kragujevac, Serbia

Key words

- aromatic plants
- essential oils
- antioxidant and antimicrobial activity
- multiresistant bacteria

Abstract

The objective of the present study to perform a comparative analysis of the chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of the essential oils of plant species *Hyssopus officinalis*, *Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Tanacetum parthenium*, *Laserpitium latifolium*, and *Artemisia absinthium* from Balkan Peninsula. The chemical analysis of essential oils was performed by using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. Monoterpenes were dominant among the recorded components, with camphor in *T. parthenium*, *A. grandifolia*, and *A. crithmifolia* (51.4, 45.4, and 25.4%, respectively), 1,8-cineole in *H. officinalis*, *A. grandifolia*, and *A. crithmifolia* (49.1, 16.4, and 14.8%, respectively), and sabinene in *L. latifolium* and *A. absinthium* (47.8 and 21.5%). The antiradical and antioxidant activities were determined by using 2,2'-azino-

bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging methods. The essential oil of *A. grandifolia* has shown the highest antioxidant activity [IC₅₀ of 33.575 ± 0.069 mg/mL for 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2.510 ± 0.036 mg vitamin C/g for the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) assay]. The antimicrobial activity against 16 multiresistant pathogenic bacteria isolated from human source material was tested by the broth microdilution assay. The resulting minimum inhibitory concentration/minimum bactericidal concentration values ranged from 4.72 to 93.2 mg/mL. Therefore, the essential oils of the plant species included in this study may be considered to be prospective natural sources of antimicrobial substances, and may contribute as effective agents in the battle against bacterial multiresistance.

Introduction

One of the major problems in the field of medicine in the last few decades is the spread of antibiotic resistance in bacteria. Bacteria have very good mechanisms of genetic adjustment, leading to the occurrence of antibiotic resistance [1]. Bacteria showing significant resistance to the existing antibiotics include *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant-MRSA) [2], *Pseudomonas aeruginosa* [3], and *Acinetobacter* spp. [4], among others. In the course of affecting the pathogenic bacteria, antibiotics also non-selectively affect the nonpathogenic bacteria, causing unpredictable genetic changes [5]. This is the motive for the ongoing search for new agents with antibiotic effects. One of the most significant natural sources of antimicrobial agents includes herbs rich in volatile compounds [6]. Many of them have been used in traditional medicine among Balkan nations for the

treatment of diverse health problems, primarily infectious diseases [7]. In addition to the medicinal purposes, a plant species rich in essential oils may also find its application in food and beverage products, cosmetic preparations, perfumes, and aromatherapy [8].

The subject of our research included six aromatic plant species belonging to the mint (Lamiaceae), parsley (Apiaceae), and sunflower (Asteraceae) families. The representatives of these groups are known for their richness in volatile compounds. The economic and medical importance of these families is augmented by their diversity and ubiquitous presence in Europe, including Balkan Peninsula [8,9]. Herbal substances derived from the aerial (aboveground) parts of species included in this study [*Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae), *Achillea crithmifolia* Waldst. & Kit. (Asteraceae), *Achillea grandifolia* Friv., *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip.

received May 21, 2015
revised January 3, 2016
accepted January 17, 2016

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-101942>
Published online
Planta Med © Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York ·
ISSN 0032-0943

Correspondence

Nemanja Stanković
Institute for Public Health
Bul. Dr Zorana Džindića 50
18 000 Niš
Serbia
Phone: +381 18 522 222
Fax: +381 18 422 5974
nemanjastanko@yahoo.com

- thenium L.) essential oil on some microbial strains. Zahedan J Res Med Sci 2013; 15: 8–13
- 23 Mazzanti G, Battinelli L, Salvatore G. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae). Flavour Frag J 1998; 13: 289–294
 - 24 Mitić V, Đorđević S. Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Serbia. FU Phys Chem Tech 2000; 2: 105–108
 - 25 Kizil S, Haşimi N, Tolan V, Kiliç E, Karataş H. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca 2010; 38: 99–103
 - 26 Mahboubi M, Haghi G, Kazempour N. Antimicrobial activity and chemical composition of *Hyssopus officinalis* L. essential oil. J Biol Active Prod Nat 2011; 1: 132–137
 - 27 Alizadeh A, Alizadeh O, Sharafzadeh SH, Mansoori S. Effect of different ecological environments on growth and active substances of garden thyme. Adv. Environ. Biol 2011; 5: 780–783
 - 28 Dehghanzadeh N, Ketabchi S, Alizadeh A. Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyssopus officinalis* L. grown in Iran. Asian J Exp Biol Sci 2012; 3: 767–771
 - 29 Mitić V, Stankov-Jovanović V, Djordjević A, Ilić M, Simonović S, Stojanović G. Chemical composition of the essential oil of *Laserpitium latifolium* from Serbia. Nat Prod Commun 2015; 10: 649–651
 - 30 Popović V, Petrović S, Milenković M, Drobac M, Couladis M, Niketić M. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Laserpitium latifolium* L. and *L. ochridanum* Micevski (Apiaceae). Chem Biodivers 2015; 12: 170–177
 - 31 Chialva F, Liddle PAP, Doglia G. Chemotaxonomy of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). I. Composition of the essential oil of several chemotypes. Z Lebensm Unters Forsch 1983; 176: 363–366
 - 32 Juteau F, Jerkovic I, Masotti V, Milos M, Mastelic J, Bessiere JM, Viano J. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. Planta Med 2003; 69: 158–161
 - 33 Orav A, Raal A, Arak E, Müürisepp M, Kailas T. Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin. Proc Estonian Acad Sci Chem 2006; 55: 155–165
 - 34 Blagojević P, Radulović N, Palić R, Stojanović G. Chemical composition of the essential oils of Serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. J Agric Food Chem 2006; 54: 4780–4789
 - 35 Rezaeiodehi A, Khangholi S. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. Pak J Biol Sci 2008; 11: 946–949
 - 36 Baykan Erel Ş, Reznicek G, Şenol SG, Karabay Yavaşoğlu NÜ, Konyalıoğlu S, Zeybek AU. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. Türk J Biol 2012; 36: 75–84
 - 37 Judzentiene A, Budiene J, Gircyte R, Masotti V, Laffont-Schwob I. Toxic activity and chemical composition of Lithuanian wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils. Rec Nat Prod 2012; 6: 180–183
 - 38 Joshi RK. Volatile composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing in Western Ghats region of North West Karnataka, India. Pharm Biol 2013; 51: 888–892
 - 39 Pavlović M, Petrović S, Milenković M, Kukić J, Couladis M, Tzakou O, Niketić M. Composition and antiradical capacity of *Achillea grandifolia* essential oil from Serbia. Planta Med 2008; 74: P112
 - 40 Martysiak-Zurowska D, Wenta W. A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. Acta Sci Pol Technol Aliment 2012; 11: 83–89
 - 41 Albayrak S. The volatile compounds and bioactivity of *Achillea sieheana* Stapf. (Asteraceae). Iran J Pharm Res 2013; 12: 37–45
 - 42 Chou ST, Peng HY, Hsu JC, Lin CC, Shih Y. *Achillea millefolium* L. essential oil inhibits LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. Int J Mol Sci 2013; 14: 12978–12993
 - 43 Keville K. [Herbs for health and healing]. Emmaus, PA: Rodale Press; 1996: 36
 - 44 Chehregani A, Hajsadeghian S, Amiri H. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Tanacetum parthenium* and *T. polyccephalum* from Iran. Planta Med 2009; 75: P130
 - 45 Radulović NS, Randjelović PJ, Stojanović NM, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ, Ilić IR, Djordjević VB. Toxic essential oils. Part II: chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of *Artemisia annua* L. volatiles. Food Chem Toxicol 2013; 58: 37–49
 - 46 Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. Int J Food Microbiol 2004; 94: 223–253
 - 47 Cal K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. Planta Med 2006; 72: 311–316
 - 48 Clevenger JP. Content of essential oil in plants. Amer. Perfumer and Essential Oil Rev 1928; 23: 467–503
 - 49 Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th edition. Carol Stream, IL: Allured Pub Corp; 2007
 - 50 Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1958; 181: 1199–1200
 - 51 Miller NJ, Rice-Evans C. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS* radical cation assay. Free Radic Res 1997; 26: 195–199
 - 52 NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement M100-S11. Wayne, PA: CLSI; 2003



Contents lists available at ScienceDirect

NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/njas

Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula

Nemanja Stanković^{a,*}, Tatjana Mihajilov-Krstev^b, Bojan Zlatković^b,
Vesna Stankov-Jovanović^b, Violeta Mitić^b, Jovana Jović^b, Ljiljana Čomić^c,
Branislava Kocić^d, Nirit Bernstein^e

^a Institute of Public Health, Bul. Dr Zorana Džindića 50, 18 000 Niš, Serbia^b University of Niš, Faculty of Science and Mathematics, Vršinačka 33, 18 000 Niš, Serbia^c University of Kragujevac, Faculty of Science and Mathematics, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia^d University of Niš, Faculty of Medicine, Bul. Dr Zorana Džindića, br 81, 18 000 Niš, Serbia^e Institute of Soil Water and Environmental Sciences, Volcani Center, Israel

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2014

Received in revised form 7 October 2015

Accepted 24 December 2015

Available online xxx

Keywords:

Methanol extracts
medicinal herbs
antibacterial activity
antioxidant activity
pathogenic bacteria.

ABSTRACT

Negative effects of available antibiotics and the constant development of bacterial resistance motivate a search for new antimicrobial agents. Aromatic plants have traditionally been used as antibacterial agents and are well accepted today as a source of antioxidants. The present study evaluated the antibacterial activities and antioxidant capacity of eight aromatic plants, indigenous to the flora of the Balkan Peninsula, which are used as medicinal plants in traditional medicine. The plants studied were *Hyssopus officinalis*, *Angelica paniculata*, *Angelica sylvestris*, *Laserpitium latifolium*, *Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium*. The antimicrobial activities of methanolic extracts of the plant tissues against 16 bacterial isolates of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* were investigated using a microdilution assay. Minimal inhibitory concentration (MIC) of the extracts ranged from 6.3 to 100 mg mL⁻¹, and minimal bactericidal concentration (MBC) ranged from 12.5 to 100 mg mL⁻¹. Antioxidant potential of the extracts was analyzed as contents of total phenols and flavonoids; radical scavenging activity by the ABTS^{•+} and DPPH[•] methods, and reducing power by the iron (III) to iron (II) reduction assay, and the ferric reducing antioxidant power assay (FRAP). Results of antioxidative activities from the 4 methods demonstrated similar sequence of activity: *A. crithmifolia* > *A. grandifolia* > *H. officinalis* > *A. absinthium* > *T. parthenium* > *L. latifolium* > *A. paniculata* > *A. sylvestris*. The total content of polyphenols and flavonoids in the methanol extracts of the studied species positively correlated with their antioxidant properties, confirming their major role in antioxidant activity of these species.

© 2016 Published by Elsevier B.V. on behalf of Royal Netherlands Society for Agricultural Sciences.

1. Introduction

Infectious diseases are a major cause of morbidity and reduced mortality particularly in developing countries. A wide range of synthetic and semi-synthetic antibacterial agents is available today for the control of microorganisms; however resistance of bacteria to the available antibacterial agents is growing rapidly [1,2]. Along with the beneficial effects of bacterial control, the available antibiotics also cause various adverse drug reactions such as hypersensitivity and immunosuppression [3,4]. Due to these negative

effects, and the constant development of bacterial resistance, there is a continuous need to develop newer antimicrobial agents effective against microorganisms and less harmful to the host. Therefore, the pharmaceutical industry is motivated to develop alternative antimicrobial drugs.

One of the most significant natural sources of antimicrobial agents are essential-oil containing aromatic-plants, many of which are used in traditional medicine primarily to combat infectious diseases [5]. Plants containing natural products have been used worldwide in traditional medicine since antiquity [6] and are a source of potential and powerful drugs [7]. The potential of higher plants as a source for new drugs is still largely unexplored, and among the estimated 250,000- 500,000 plant species, only a small fraction has been submitted to biological or pharmacological

* Corresponding author. Tel.: +381 18 522 222.

E-mail address: nemanjastanko@yahoo.com (N. Stanković).<http://dx.doi.org/10.1016/j.njas.2015.12.006>

1573-5214/© 2016 Published by Elsevier B.V. on behalf of Royal Netherlands Society for Agricultural Sciences.

Please cite this article in press as: N. Stanković, et al., Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula, NJAS - Wageningen J. Life Sci. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.njas.2015.12.006>

G Model

NJAS-198; No. of Pages 8

ARTICLE IN PRESS

8

N. Stanković et al. / NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences xxx (2015) xxx–xxx

- extracts of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*, Ital J Food Sci 18 (2006) 73–84.
- [19] Z.K. Shinwari, I. Khan, S. Naz, A. Hussain, Assessment of antibacterial activity of three plants used in Pakistan to cure respiratory diseases, Afr J Biotechnol 8 (2009) 7082–7086.
- [20] A.M. Janssen, J.J.C. Scheffer, A. Baerheim Svendsen, Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–1986 literature review. Aspects of the test methods, Planta Medica 53 (1987) 396–398.
- [21] Z. Kalodera, S. Pepelnjak, N. Blazevic, T. Petrak, Chemical composition and antimicrobial activity of *Tanacetum parthenium* essential oil, Pharmazie 52 (1997), 885–886.
- [22] C. Karaalp, N.Y. Ayse, N. Ulku Karabay Yavasoglu, Evaluation of antimicrobial properties of Achillea L. flower head extracts, Pharm Biol 47 (2009) 86–91.
- [23] S.D. Sarker, E. Eynon, K. Fok, Y. Kumarasamy, E.M. Murphy, L. Nahar, E.M. Shaheen, N.M. Shaw, M. Siakalima, Screening the extracts of the seeds of *Achillea millefolium*, *Angelica sylvestris* and *Pheum pratense* for antibacterial, antioxidant activities and general toxicity, OPEM 3 (2003) 157–162.
- [24] H. Alinezhad, R. Azimi, M. Zare, M.A. Ebrahimzadeh, S. Eslami, S.F. Nabavi, S.M. Nabavi, Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves, and stems of *Hyssopus officinalis* L. var. *angustifolius*, Int J Food Prop 16 (2013) 1169–1178.
- [25] C. Wu, F. Chen, X. Wang, H.J. Kim, G.Q. He, V. Haley-Zitlin, G. Huang, Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification, Food Chem 96 (2006) 220–227.
- [26] R. Singh, P.K. Verma, G. Singh, Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*, J Intercult Ethnopharmacol. 1 (2012) 101–104.
- [27] V. Popović, A. Heyerick, S. Petrović, S. van Calenberg, I. Karalić, M. Niketić, D. Deforce, Cytotoxic activity of *Laserpitium latifolium* L. extract and its daucane and phenylpropanoid constituents, Rec Nat Prod 7 (2013) 245–249.
- [28] M.B. Arnao, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case, Trends Food Sci Technol 11 (2000) 419–421.
- [29] Tucakov J. (1997) *Phytotherapy*. Belgrade: Rad, VII edition; pp 717.
- [30] S. Tasić, K. Šavikin-Fodulović, N. Menković, Guide through the world of medicinal plants, Valjevac, Valjevo, 2004, pp. 202.
- [31] M. Mahboubi, G. Haghi, N. Kazempour, Antimicrobial activity and chemical composition of *Hyssopus officinalis* L. Essential oil, J Biol Active Prod from Nat 1 (2011) 132–137.
- [32] I. Asenov, C. Gusev, G. Kitanov, S. Nikolov, T. Petkov, Bilkosabiranje – rakovodstvo za brane i parvična prerabotka na lečebni rastenija, Biler, Sofia, 1998, pp. 367.
- [33] Asenov I. (1982) *Laserpitium* L. In: Kožuharov (ed.), *Flora republicae popularis Bulgariae* Vol. 7, In Aedibus Academiae Scientiarum Bulgariae, Serdica; pp 258–266.
- [34] N.S. Radulović, P.D. Blagojević, D. Skropeta, A.R. Zarubica, B.K. Zlatković, R.M. Palić, Misidentification of Tansy, *Tanacetum macrophyllum*, as Yarrow, *Achillea grandifolia*: a Health Risk or Benefit? Nat Prod Commun 5 (2010) 121–127.
- [35] Y.M. Djafoua, R.S. Mouokeu, C. Tume, M.O. Kamtchueng, J.R. Kuiaie, Immunomodulatory activity of methanol leaf extracts of Cameroonian medicinal plants, J Complement Integr Med. (2015) 2014–2023, <http://dx.doi.org/10.1515/jcim-2014-0023>.
- [36] K.J. Park, Evaluation of in vitro antiviral activity in methanol extracts against influenza virus type A from Korean medicinal plants, Phytother Res. 17 (2003) 1059–1063.
- [37] R.M. Marita, C.K.P.O. Ogo, N.O. Ogo, P.O. Okemo, Antitubercular and phytochemical investigation of methanol extracts of medicinal plants used by the samburu community in Kenya, Trop J Pharm Res. 9 (2010) 379–385.
- [38] NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA.
- [39] V.D. Mitić, V.P. Stanković-Jovanović, O.P. Jovanović, I.R. Palić, A.S. Djordjević, G.S. Stojanović, Composition and antioxidant activity of hydrodistilled essential oil of Serbian *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber ssp. *chia* (Schreber) Arcangel, JEOR 23 (2011) 70–74.
- [40] G. Stojanović, I. Stojanović, V. Stanković-Jovanović, V. Mitić, D. Kostić, Reducing power and radical scavenging activity of four Parmeliaceae species, Cent Eur J Biol 5 (2010) 808–813.
- [41] V. Mitić, V.S. Jovanović, M. Dimitrijević, J. Cvetković, S. Simonović, S.N. Mandić, Chemometric analysis of antioxidant activity and anthocyanin content of selected wild and cultivated small fruit from Serbia, Fruits 69 (2014) 413–422.
- [42] H.B. Li, K.W. Cheng, C.C. Wong, K.W. Fan, F. Chen, Y. Jiang, Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae, Food Chem 102 (2007) 771–776.
- [43] S.P. Wong, P.L. Lai, H.W.K. Jen, Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants, Food Chem. 99 (2006) 775–783.
- [44] P. Cos, J.V. Arnold, V.B. Dirk, M. Louis, Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept', J Ethnopharmacol 106 (2006) 290–302.
- [45] N. Bernstein, M. Kravchik, N. Dudai, Salinity-induced changes in essential oil, pigments and salts accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum*), in relation to alterations of morphological development, Ann Appl Biol. 156 (2009) 167–177.
- [46] J. Gorelick, N. Bernstein, Elicitation: An underutilized tool for the development of medicinal plants as a source for therapeutic secondary metabolites, In: Advances in Agronomy 124 (2014) 201–230.
- [47] N.C. Nascimento, A.G. Fett-Neto, Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview, Methods Mol Biol. 643 (2010) 1–13.
- [48] A. Kumaran, R.J. Karunakaran, Antioxidant and free radical scavenging activity of aqueous extract of *Coleus aromaticus*, Food Chem 97 (2006) 109–114.
- [49] J.H. Chen, C.T. Ho, Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid, J Agric Food Chem 45 (1997) 2374–2378.
- [50] L. Rubió, M.J. Motilva, M.P. Romero, Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles, Crit Rev Food Sci Nutr 53 (2013) 943–953.
- [51] O. Tzakou, H. Skaltsa, C. Harvala, Flavonoids from *Achillea crithmifolia* Waldst. and Kit, Sci Pharm 64 (1996) 197–202.
- [52] S. Konyalioglu, C. Karamenderes, Screening of total flavonoid, phenol contents and antioxidant capacities of some Achillea L. species growing in Turkey, Acta Pharmaceutica Turcica 46 (2004) 163–170.
- [53] A. Pareek, M. Suthar, G.S. Rathore, V. Bansal, Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review, Pharmacogn Rev 5 (2011) 103–110.
- [54] W. Changqing, C. Feng, W. Xi, K. Hyun-Jin, Guo-qing He, V. Haley-Zitlin, G. Huang, Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification, Food Chem 96 (2006) 220–227.
- [55] N. Wang, X. Yang, Two new flavonoid glycosides from the whole herbs of *Hyssopus officinalis*, J Asian Nat Prod Res 12 (2010) 1044–1050.
- [56] M.A. Ebrahimzadeh, S.M. Nabavi, S.F. Nabavi, F. Bahramian, A.R. Bekhradnia, Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *Cspaciosum*, Pak J Pharm Sci 23 (2010) 29–34.
- [57] H. Ludmila, C. Viera, Antiradical activity and the reduction power of herbal extracts and their phenolic acids, Bulletin Potravinarskeho Vyskumu 44 (2005) 237–247.
- [58] Y. Murakami, T. Omoto, I. Asai, K. Shimomura, K. Yoshihira, K. Ishimaru, Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*, Plant Cell Tissue Organ Cult 53 (1998) 75–78.
- [59] E. Varga, Z. Hajdu, K. Veres, I. Mathe, E. Nemeth, Z. Pihur, J. Bernath, Production biology and chemical variants of *Hyssopus officinalis*, Acta Pharm Hung 68 (1998) 183–188.
- [60] E. Kochan, H. Wysokinska, A. Chmiel, B. Grabias, Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis*, Biosciences 54 (1999) 11–16.
- [61] G. Zgorka, K. Głowniak, Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family, J Pharm Biomed Analysis 26 (2001) 79–87.

Please cite this article in press as: N. Stanković, et al., Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula, NJAS - Wageningen J. Life Sci. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.njas.2015.12.006>

Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije

Nemanja S. Stanković¹, Ljiljana R. Čomić², Branislava D. Kocić³, Dejan M. Nikolić⁴,
Tatjana M. Mihajilov-Krstev⁵, Budimir S. Ilić⁶, Dragoljub L. Miladinović⁶

¹Odsek za sanitarnu mikrobiologiju, Institut javnog zdravlja, Niš, Srbija

²Odsek za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

³Odsek za mikrobiologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

⁴Odsek za sanitarnu hemiju, Institut javnog zdravlja, Niš, Srbija

⁵Odsek za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

⁶Odsek za farmaciju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

Izvod

U radu su prikazani rezultati proučavanja hemijskog sastava i antibakterijske aktivnosti etarskih ulja gajenih biljnih vrsta *Thymus vulgaris* L. (timus) i *Lavandula angustifolia* L. (lavanda) iz Srbije na pet vrsta bakterija, laboratorijskog kontrolnog soja i kliničkih izolata, s ciljem uspostavljanja i objašnjenja odnosa antibakterijske aktivnosti–hemijski sastav. Hemijska analiza etarskih ulja je realizovana korišćenjem gasne hromatografije (GC) i gasne hromatografije/masene spektrometrije (GC/MS), dok je antibakterijska aktivnost određivana mikrodilucionom metodom. Dominantne komponente etarskog ulja timusa su timol (59,95%) i p-cimen (18,34%), dok su linalil acetat (38,23%) i linalol (35,01%) osnovne komponente etarskog ulja lavande. Utvrđeno je da oba etarska ulja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost na sve testirane bakterijske sojeve. Gram-pozitivne bakterije su znatno osetljivije na ulje timusa, dok etarsko ulje lavande ispoljava veću aktivnost na Gram-negativne bakterije. Poredeći bakteriocidne koncentracije etarskih ulja, utvrđene su niže vrednosti za *T. vulgaris* i više vrednosti za *L. angustifolia*.

Кljučne речи: *Thymus vulgaris*; *Lavandula angustifolia*; antibakterijska aktivnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

NAUČNI RAD

UDK 547.913:58]:544:615.281

Hem. Ind. 65 (5) 583–589 (2011)

dol: 10.2298/HEMIND110517051S

Sintetički antibiotici, penicilin, streptomycin i ostali, su od svog otkrića u dvadesetom veku, značajno uticali na smanjenje rizika od nastanka zaraznih bolesti. S druge strane poslednjih godina su bakterijske infekcije (infekcija respiratornog trakta, meningitis, polne bolesti) sve učestalije, uzrokovane pre svega rezistentnošću bakterija na sintetičke antibiotike [1]. Stoga je neophodno razviti prirodan i bezbedan način kontrole i zaštite ljudi i životinja od bakterijskih infekcija. Za veliki broj etarskih ulja se zna da poseduju antimikrobna svojstva i da je u mnogim slučajevima ova aktivnost posledica prisustva različitih klasa monoterpena [2]. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i njihovih komponenata može varirati od delimične do potpune inhibicije rasta bakterije, tako da etarska ulja ispoljavaju bakteriostatičku ili bakteriocidnu aktivnost [3].

Metode ispitivanja antimikrobne aktivnosti možemo podeliti na difuzione, dilucione i bioautografske metode [4]. Metodološki pristup i mogućnost primene navedenih metoda su objašnjeni u literaturi, ali se čini da

ipak ne postoji standardni test za procenu antibakterijske aktivnosti potencijalnih antimikrobnih agenasa [5]. Cilj ovog rada je bio da se utvrdi moguća veza između komponenata etarskog ulja i njihove antibakterijske aktivnosti. *Thymus vulgaris* i *Lavandula angustifolia* su izabrani radi poređenja antibakterijske aktivnosti dominantnih klasa jedinjenja etarskih ulja: oksidovanih monoterpena lavande i fenolnih jedinjenja timusa. Drugi razlog za proučavanje ovih biljnih vrsta je provera kontradiktornih literaturnih podataka o realnoj antibakterijskoj moći lavande, u poređenju sa dokazanom antibakterijskom aktivnošću etarskog ulja timusa.

EKSPERIMENTALNI DEO

Biljni materijal

Biljne vrste *T. vulgaris* i *L. angustifolia* sakupljene su u julu 2010. godine na oglednom polju Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr. Josif Pančić“, Pančevo, Srbija.

Izolovanje ulja

Sprašena droga podvrgnuta je procesu hidrodestilacije na Clavenger aparatu u trajanju od 3 sata. Izolovana etarska ulja su osušena anhidrovanim natrijum-sulfatom i čuvana na temperaturi od 4 °C.

Prepiska: N.S. Stanković, Odsek za sanitarnu mikrobiologiju, Institut javnog zdravlja, Bulevar dr Zorana Đinđića 50, 18000 Niš, Srbija.

E-pošta: nemanjastankovic@hotmail.com

Rad primljen: 17. maj, 2011

Rad prihvaćen: 22. jul, 2011

SUMMARY

ANTIBACTERIAL ACTIVITY CHEMICAL COMPOSITION RELATIONSHIP OF THE ESSENTIAL OILS FROM CULTIVATED PLANTS FROM SERBIA

Nemanja S. Stanković¹, Ljiljana R. Čomić², Branislava D. Kocić³, Dejan M. Nikolić⁴, Tatjana M. Mihajilov-Krstev⁵, Budimir S. Ilić⁶, Dragoljub L. Miladinović⁶

¹Department of Sanitary Microbiology, Institute of Public Health, Niš, Serbia

²Department of Biology and Ecology, Faculty of Science and Mathematics, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Department of Microbiology, School of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia

⁴Department of Sanitary Chemistry, Institute of Public Health, Niš, Serbia

⁵Department of Biology and Ecology, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš, Niš, Serbia

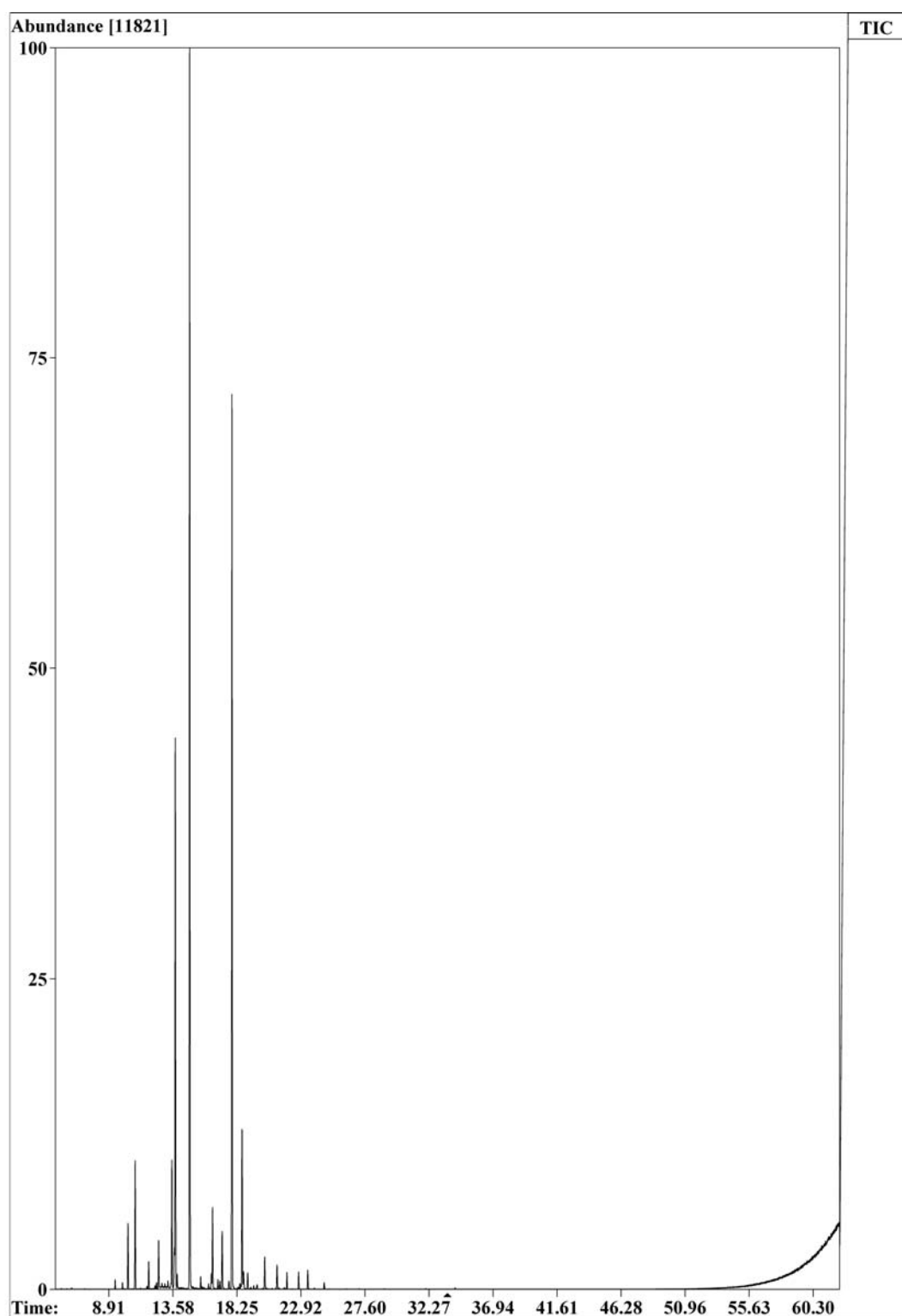
⁶Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia

(Scientific paper)

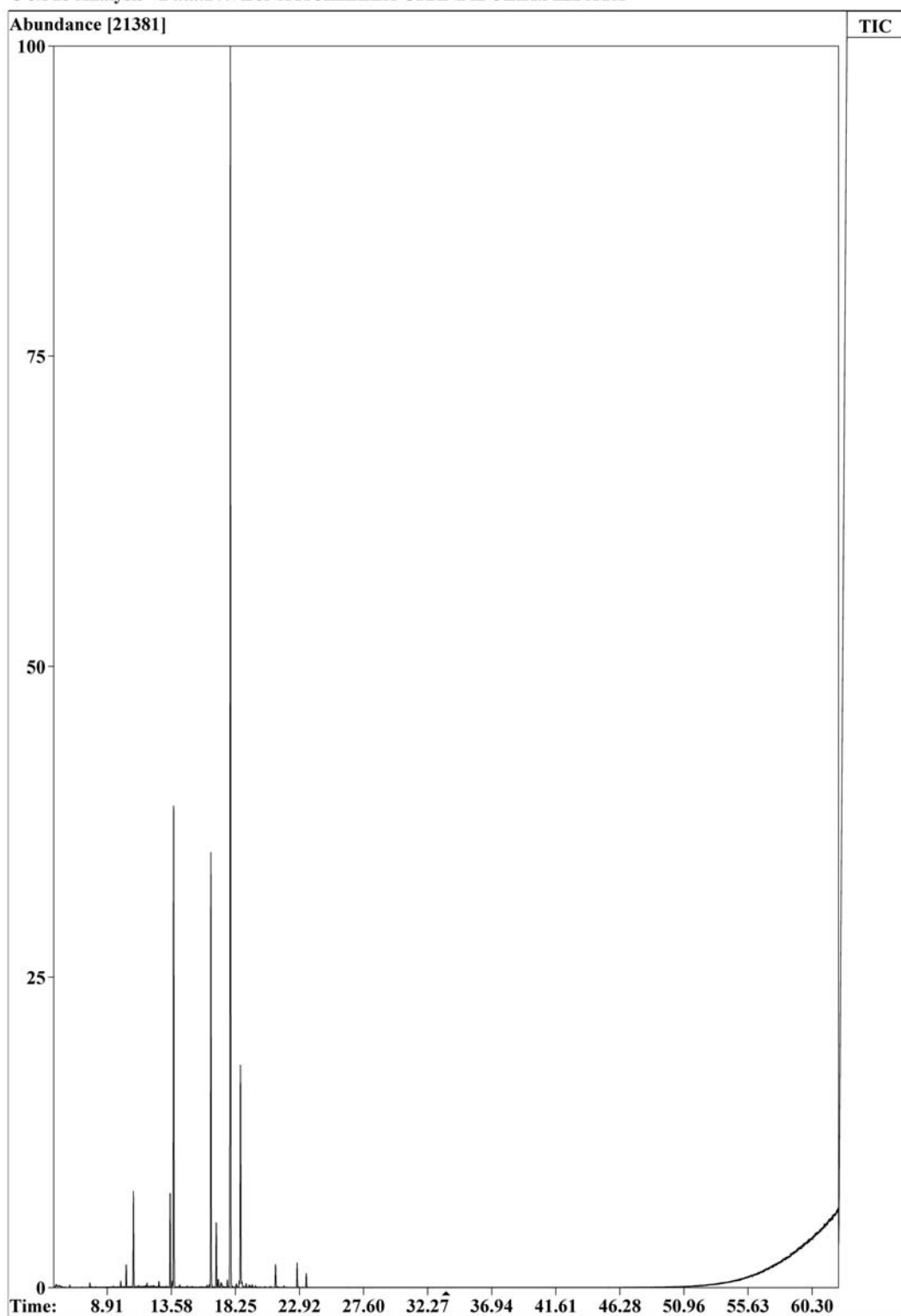
The antibacterial effects of essential oils from Serbian cultivated plants, *Thymus vulgaris* L. (Lamiace) and *Lavandula angustifolia* L. (Lamiace) on different bacteria were investigated, with an emphasis on an antibacterial activity–chemical composition relationship. Essential oil was obtained from airdried aerial parts of the plants by hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The essential oil analyses were performed simultaneously by gas chromatography (GC) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) systems. The main constituents of thyme oil were thymol (59.95%) and *p*-cymene (18.34%). Linalyl acetate (38.23%) and linalool (35.01%) were main compounds in lavender oil. The antibacterial activity of the essential oils samples was tested towards 5 different bacteria: laboratory control strain obtained from the American Type Culture Collection and clinical isolates from different pathogenic media. Gram-negative bacteria were represented by *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43895 and *Salmonella enteritidis* ATCC 9027 while researched Gram-positive strains were *Bacillus cereus* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Essential oils from thyme have been found to have antimicrobial activity against all microorganisms tested, with a range of MIC values from 0.025 to 0.10 µl/ml and MBC values from 0.05 to 0.78 µl/ml. Lavender oils demonstrated MIC values from 0.025 to 0.20 µl/ml and MBC values from 0.05 and 0.78 µl/ml. Reference antibiotic tetracycline was active in concentrations between 0.025 and 0.05 µl/ml. The Gram-positive bacteria were more sensitive to the essential oil of thyme, while Gram-negative bacteria were more sensitive to the essential oil of lavender. Essential oils from thyme and lavender may be used at low concentrations for prevention and treatment of infective diseases in animals and humans caused by pathogenic bacterial species.

Keywords: *Thymus vulgaris* • *Lavandula angustifolia* • Antibacterial activity

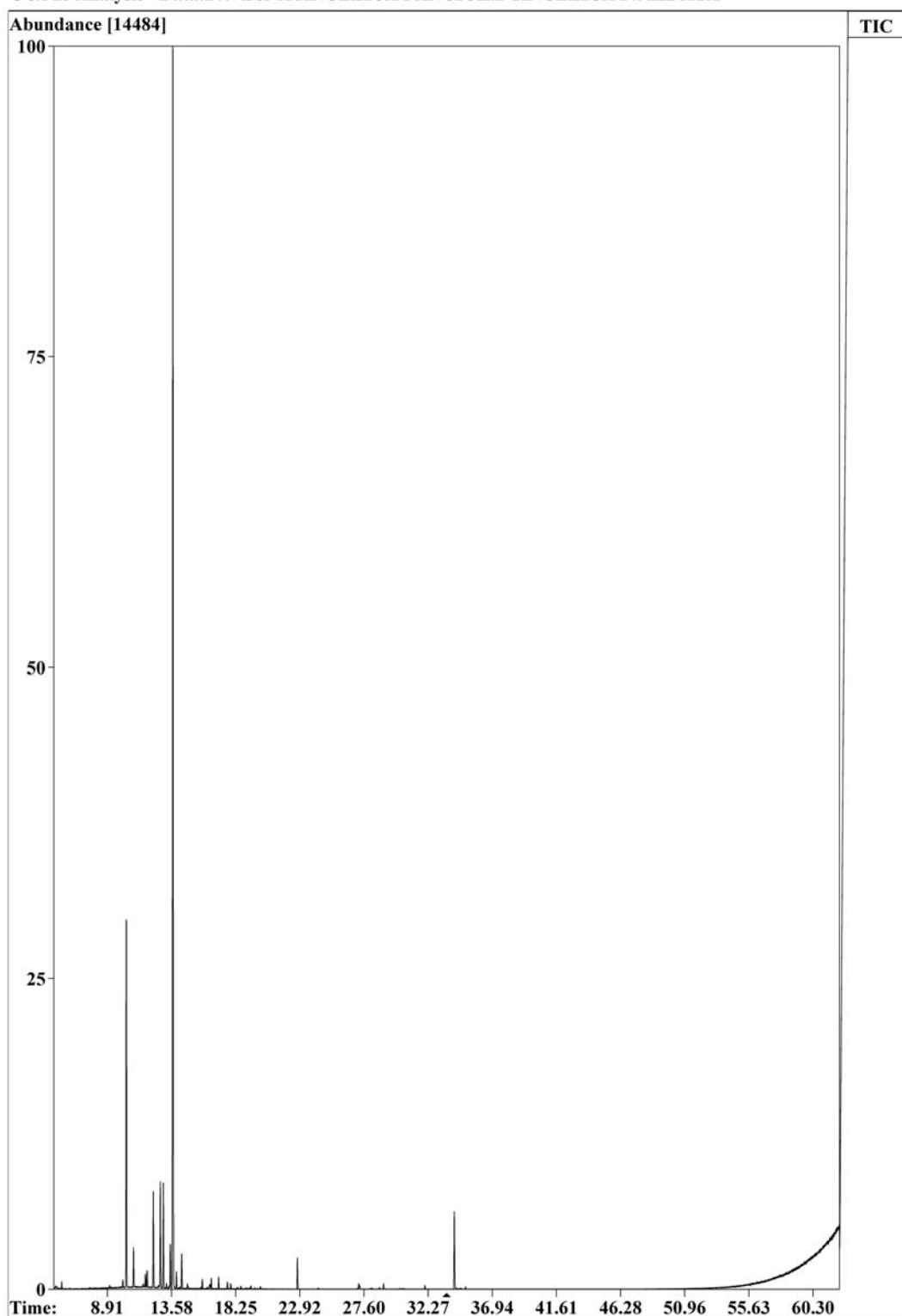
GC/MS Analysis –Data:F:\VESNA\ACHILLEA CRITHMIFOLIA.MZDATA

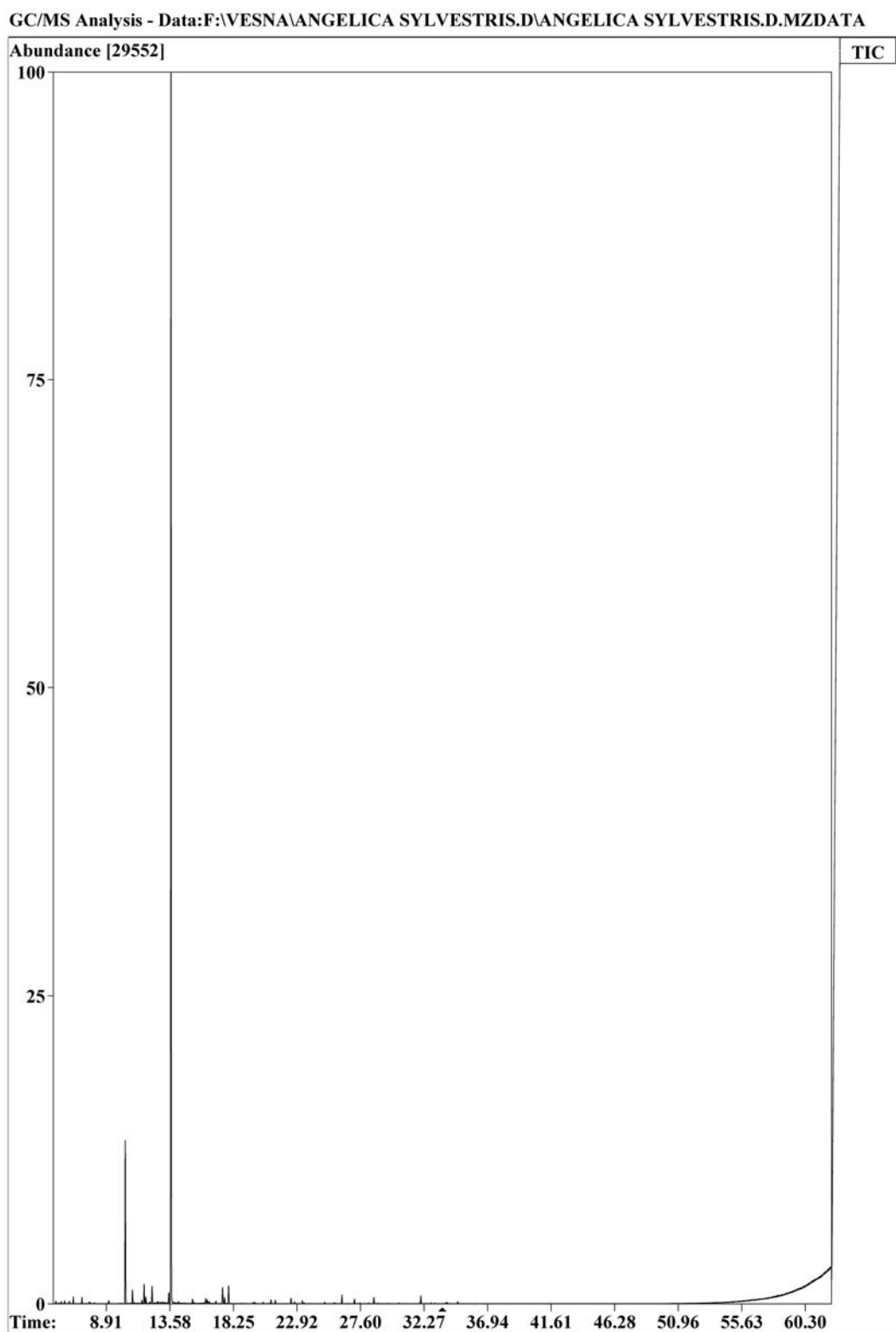


GC/MS Analysis - Data:F:\VESNA\ACHILLEA GRANDIFOLIA.MZDATA

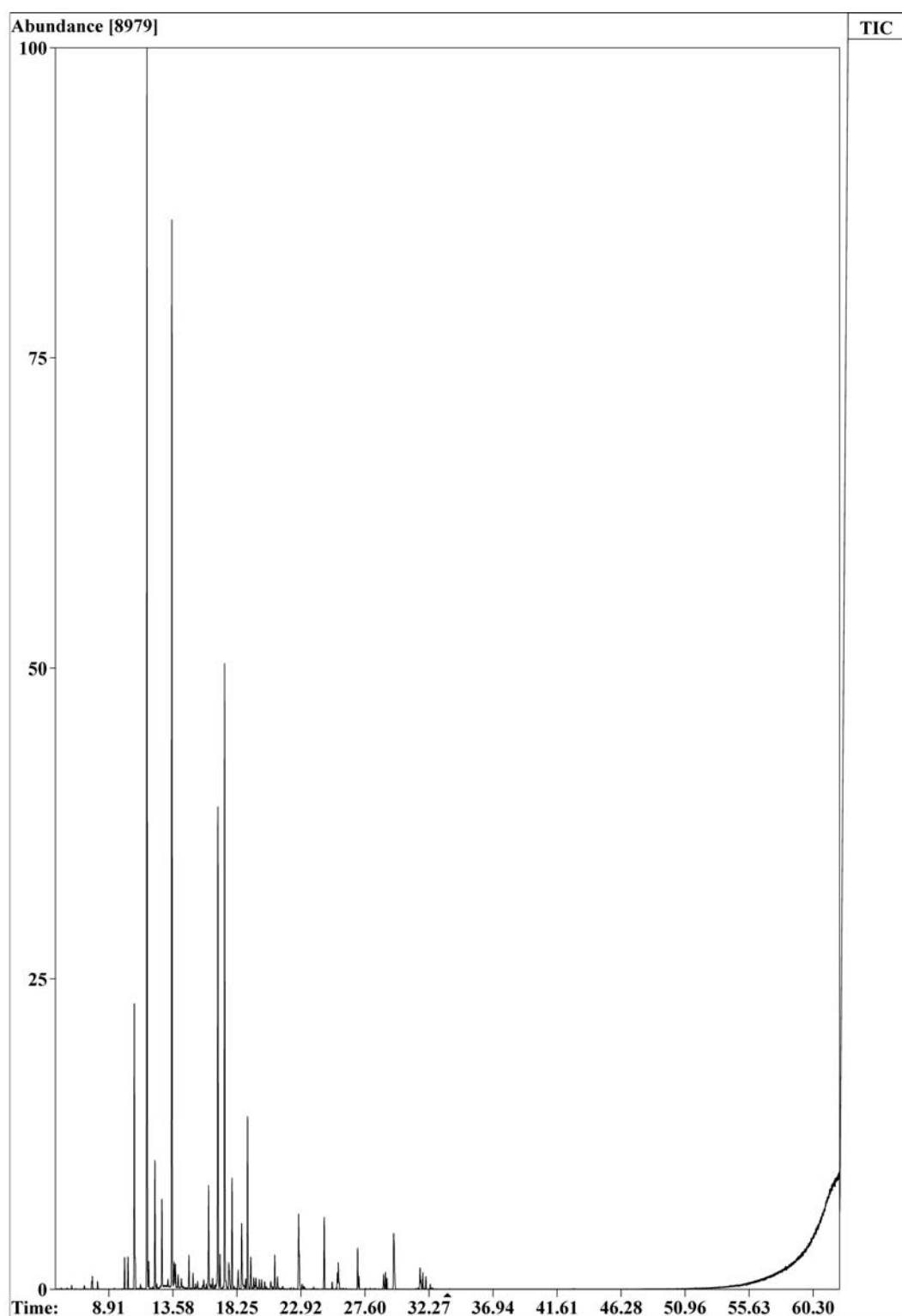


GC/MS Analysis - Data: F:\VESNA\ANGELICA PANCICILD\ANGELICA P.MZDATA

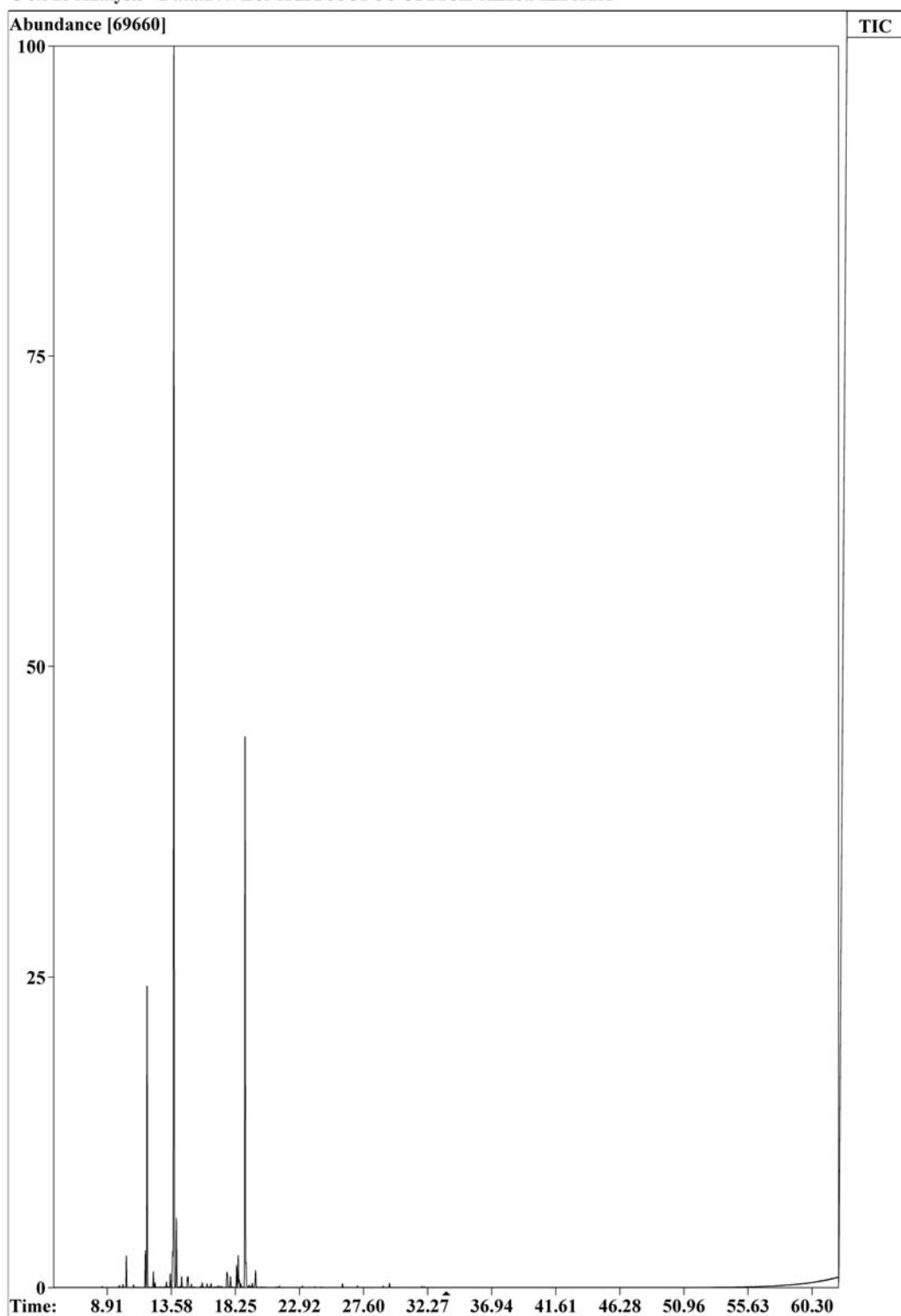




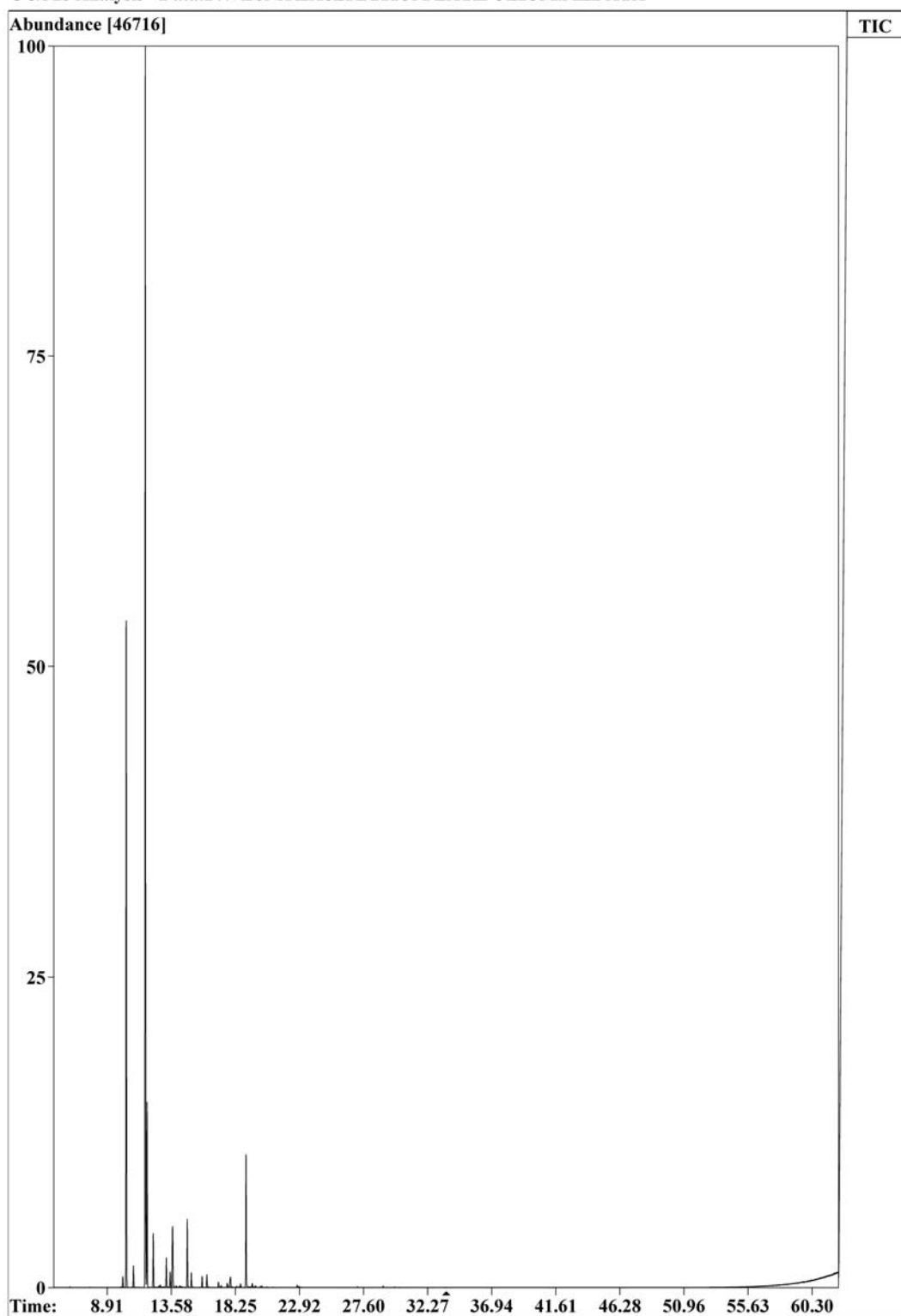
GC/MS Analysis –Data:F:\VESNA\ARTEMISIA ABSINTHIUM.MZDATA



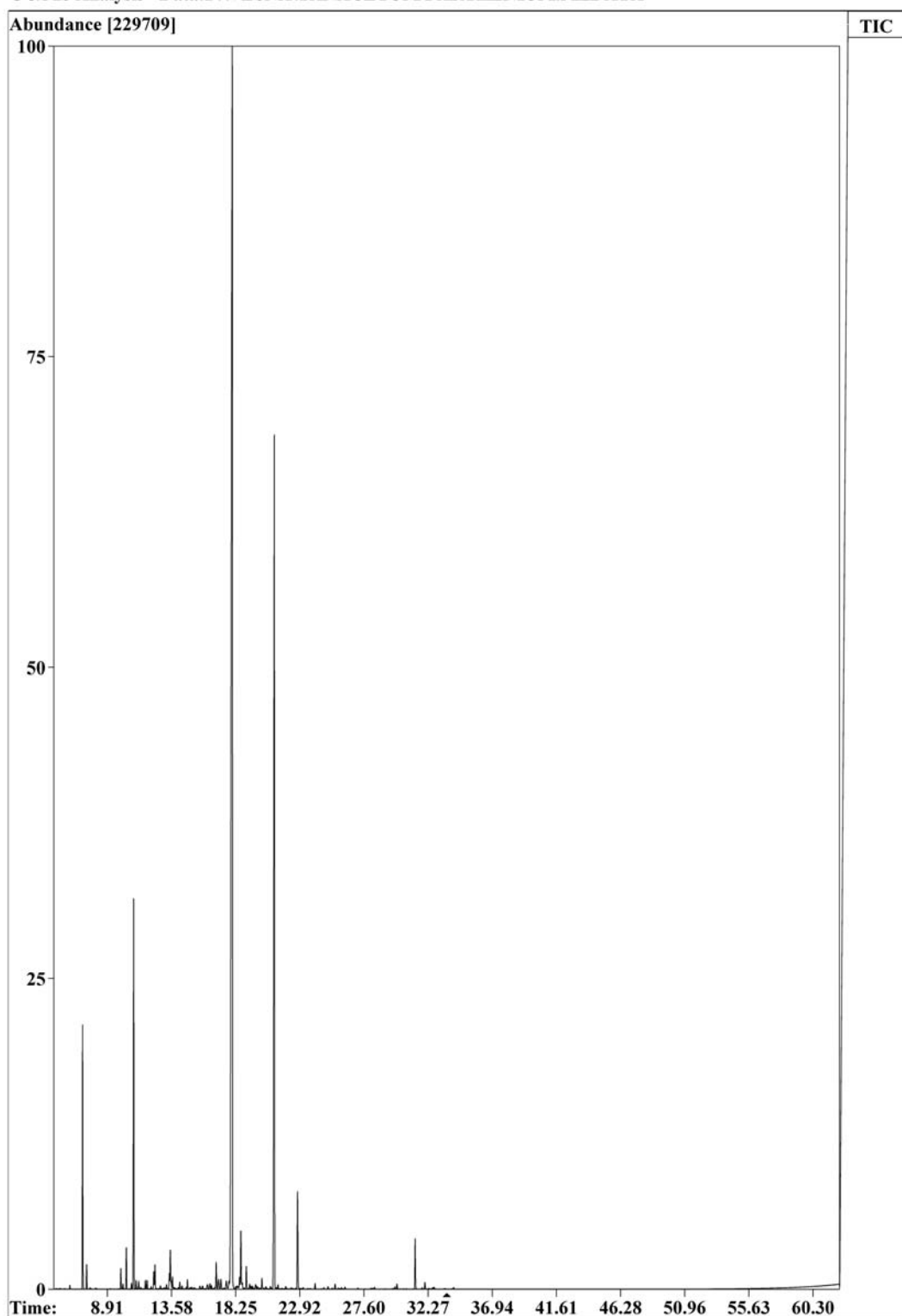
GC/MS Analysis - Data:F:\VESNA\HYSSOPUS OFFICINALIS.MZDATA



GC/MS Analysis - Data:F:\VESNA\LASERPITIUM LATIFOLIUM.MZDATA



GC/MS Analysis - Data: F:\VESNA\tANACETUM PARTHENIUM.MZDATA



Биографија

Кандидат Немања Станковић је рођен 08.05.1970. године у Нишу, Република Србија. Основну школу " Доситеј Обрадовић" и гимназију "Светозар Марковић", завршио је у Нишу са одличним успехом. Биолошки факултет у Београду завршио је 2000-те године и стекао звање дипломирани биолог. 2006-те године завршио је последипломске специјалистичке студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, област микробиологија и стекао звање специјалисте биолошких наука.

Школске 2008/2009 године је уписао последипломске академске докторске студије биологије, група изабраних предмета Микробиологија, на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. У досадашњем току студија је испунио наставним планом предвиђене обавезе и испунио услов за пријаву докторске дисертације.

Резултате својих досадашњих истраживања кандидат Немања Станковић је објавио у оквиру 12 публикација. Објавио је 4 рада у међународним часописима са SCI листе (2-M21, 2-M23), 1 у часопису националног значаја (M53), као и 7 саопштења на међународним и стручним скуповима.

У истраживачко звање истраживач-сарадник изабран је 2016. године, за научну област Биологија, у Департману за биологију и екологију Природно–математичког факултета у Нишу.

Од 2001. године је запошљен у Институту за јавно здравље у Нишу, у Лабораторији за санитарну микробиологију.

Библиографија

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У НАУЧНИМ ЧАСОПИСИМА МЕЂУНАРОДНОГ ЗНАЧАЈА (M20)

Рад објављен у врхунском међународном часопис (M21)

1. Stanković, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatković, B., Matejić, J., Stankov-Jovanović, V., Kocić, B., Čomić, Lj. (2016). Comparative Study of Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Selected Aromatic Plants from Balkan Peninsula. *Planta Med.* DOI: 10.1055/s-0042-101942.

ISSN: 0032-0943

Kategorije: Chemistry, Medicinal (33/59); Pharmacology & Pharmacy (137/255); Plant Sciences (60/204)

IF₂₀₁₄ 2.152

2. Stanković, N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatković, B., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V., Jović, J., Čomić, Lj., Kocić, B., Bernstein, N. (2016). Antibacterial and Antioxidant Activity of Traditional Medicinal Plants from the Balkan Peninsula. *NJAS-WAGEN J LIFE SC.* DOI:10.1016/j.njas.2015.12.006

ISSN: 1573-5214

Kategorije: Agriculture, Multidisciplinary (17/56)

IF₂₀₁₄ 1.143

Рад објављен у међународном часопису (M23)

1. Stanković, N., Čomić, Lj., Kocić, B., Nikolić, D., Mihajilov-Krstev, T., Ilić, B., & Miladinović, D. (2011). Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije. *Hem. Ind.* 65 (5), 583–589

ISSN:0367-598X

Kategorije: Engineering, Chemical (121/134)

IF₂₀₁₄ 0.364

2. Savić, D., Miljković-Selimović, B., Lepšanović, Z., Tambur, Z., Konstantinović, S., Stanković, N., & Ristanović E. (2015). Antimicrobial susceptibility and B-lactamase production in *Bacillus cereus* isolates from human stool, food and environmental samples. *Vojnosanit pregl.* DOI: 10.2298/VSP150415134S

ISSN:0042-8450

Kategorije: Medicine, General & Internal (141/153)

IF₂₀₁₄ 0.292

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ЧАСОПИСИМА НАЦИОНАЛНОГ ЗНАЧАЈА (M50)

Рад објављен у научном часопису (M53)

1. Stanković, N., Čomić, Lj., & Kocić, B. (2006). Microbiological correctness of spices on sale in health food stores and supermarkets in Niš, *Acta Fac Med Naiss*, 23 (2), 79-84.

РАДОВИ ОБЈАВЉЕНИ У ЗБОРНИЦИМА МЕЂУНАРОДНИХ НАУЧНИХ СКУПОВА (М30)

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (М34)

1. Stanković, N., Mihajlov-Krstev, T., Zlatković, B., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V., Ilić, M., Čomić, Lj., Kocić, B. (2013). Antimikrobna aktivnost etarskih ulja odabranih aromatičnih biljaka protiv patogenih bakterija izolovanih iz humanog materijala. Knjiga apstrakata (Elektronski izvor) – IX Kongres mikrobiologa Srbije, ISBN 978-86-914897-1-7.
2. Svetozarević-Nikolić, A., Bogojević, Z., Krivokapić, Lj., Stanković, N. (2013). Swimming pool waters - microbiological aspect. 47. Days of preventive medicine-International congress, Niš.
3. Bogojević, Z., Svetozarević-Nikolić, A., Krivokapić, Lj., Stanković, N. (2012). The presence of *Enterobacteriaceae* in thermally processed foods. 46. Days of preventive medicine-International congress, Niš.
4. Stanković, N., Čomić, Lj., Miladinović, D., Mihajlov-Krstev, T., Mladenović, M. (2011). *In vitro* antibacterial activities of some *Lamiaceae* essential oils against human pathogenes. Scientific conference: Preclinical testing of active substances and cancer reasearch with international symposium on anti-cancer agents, cardiotoxicity and neurotoxicity, Kragujevac, Serbia.
5. Svetozarević-Nikolić, A., Bogojević, Z., Krivokapić, Lj., Stanković, N., Gligorijević, S. (2010). The results of the bacteriological analysis of salad vegetables from the territory of the city of Niš. 44. Days of preventive medicine-International congress, Niš.
6. Stanković, N. (2009). Zagađenje površinskih voda. Srpsko lekarsko društvo, Sekcija za preventivnu medicinu, 43. Days of preventive medicine-International congress, Niš.
7. Svetozarević-Nikolić, A., Bogojević, Z., Krivokapić, Lj., Stanković, N. (2008). Bacteriological monitoring of the water from the swimming pools in Niš. 42. Days of preventive medicine-International congress, Niš.



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ
Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	Станковић Немања
Ментор	Проф. др Татајана Михајилов-Крстев
Наслов рада	<i>In vitro</i> контрола патогених бактерија пореклом из хуманог материјала деловањем етарских уља и екстраката одабраних биљних врста
Језик публикације	српски (ћирилица)
Језик извода	српски(с)/енглески(е)
Земља публикавања	Србија
Година публикације	2016.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	Ниш, Облачића Рада 24/33
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Микробиологија
Предметна одредница/кључне речи	антибактеријска и антиоксидативна активност етарских уља и метанолних екстраката, синергистичко деловање етарских уља и антибиотика, хемијски

	састав етарских уља и метанолних екстраката, патогене бактерије
Чува се	Библиотека Природно математичког факултета у Крагујевцу, Радоја Домановића 12, 34 000 Крагујевац
Важна напомена	Нема

Извод

Увод. Последњих деценија један од водећих проблема у медицини је стварање резистентности патогених микроорганизама на деловање антибиотика. Бактерије које показују значајну резистентност на постојеће антибиотике су: метицилин резистентни *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., итд. Приликом деловања на патогене бактерије, антибиотици неселективно утичу и на непатогене бактерије, изазивајући при том непредвидиве генетске промене. Поред корисних ефеката у деловању на бактерије, расположиви антибиотици, такође могу проузроковати нежељене ефекте као што су хиперсензитивност и имуносупресија. То је разлог због кога се трага за новим агенсима са антибиотским деловањем. Један од природних извора таквих агенаса су етарска уља и екстракти ароматичних биљака који се користе у традиционалној медицини за лечење многих инфективних болести и болести које настају као последица оксидативног стреса. Због тога је циљ истраживања ове дисертације био да се изврши компаративна анализа хемијског састава, антибактеријске и антиоксидативне активности одабраних биљних врста *Angelica panicii*, *Angelica sylvestris*, *Laserpitium latifolium*, *Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Artemisia absinthium*, *Tanacetum parthenium* и *Hyssopus officinalis* које су веома заступљене у традиционалној медицини.

Материјал и методе. Биљни материјал који је коришћен у овом истраживању је прикупљан током 2012. и 2013. године на територији југоисточне Србије. Након сушења биљног материјала, приступило се процесу изоловања етарских уља методом хидродестилације у апаратури по Клевинџеру, као и припремању метанолних екстраката алкохолном екстракцијом. Хемијски састав уља је анализиран помоћу ГХ (гасна хроматографија) и ГХ/МС (гасна хроматографија са спектрометријом маса) метода. Укупни феноли су одређивани методом по Фолин-Сјоклто-у, са малим модификацијама, а укупни флавоноиди су утврђивани коришћењем алуминијум хлорид ($AlCl_3$) колориметријског метода. Антиоксидативна активност етарских уља и екстраката је одређивана помоћу ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина), DPPH (2,2-дифенил, 1-пикрил хидразил), TRP (total reducing power) и FRAP (Ferric reducing antioxidant power) метода. Антибактеријска активност изолованих етарских уља, метанолних екстраката и четири антибиотика (ципрофлоксацин, доксициклин, гентамицин и еритромицин) је испитивана микродилуционом методом против 16 бактеријских сојева пореклом из брисева рана,

грла и носа, спутума и аспирата пацијената (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*). Синергистичко деловање најактивнијих уља и антибиотика са најслабијим деловањем, еритромицином, у циљу снижавања његових активних концентрација, је одређивно уз помоћ методе шаховске табле тј. „checkerboard“ методом.

Резултати. Приноси етарских уља испитиваних биљних врста су се кретали од 0,05% (код *Angelica sylvestris*) до 0,6% (код *Tanacetum parthenium*), док су приноси метанолних екстраката били у опсегу од 4,7% (за *Achillea crithmifolia*) до 10,1% (за *Artemisia absinthium*). Као доминантне компоненте у етарским уљима идентификоване су: код *A. crithmifolia* артемизија кетон 31,7%, камфор 25,4% и 1,8 – цинеол 14,8%, код *A. grandifolia* камфор 45,4%, 1,8-цинеол 16,4% и α -тујон 15,1%, код *A. absinthium* сабинен 21,5%, орто-цимен 19,2% и (з)-епокси-оцимен 11,0%, код *H. officinalis* 1,8-цинеол 49,1% и изопинокамфона 22,7%, код *L. latifolium* сабинен 47,8% и α -пинен 25,0%, код *T. parthenium* камфор 51,4%, транс-хризантенил ацетат 22,7%, камфен 7,3%, код *A. sylvestris* лимонен 75,3% и α -пинен 9,6%, и код *A. panicii* β -феландрен 54,9%, α -пинен 4,5% и α -феландрен 4,0%. Антибактеријско деловање испитиваних уља се кретало у оквиру тестираних концентрација од 0,10 до 93,20 mg/mL. Најјаче антибактеријско деловање показала су етарска уља биљних врста *A. sylvestris* и *A. panicii*. Минималне инхибиторне и бактерицидне концентрације ових уља кретале су се у опсегу од MIC=MBC=0,11/54,40 mg/mL (за *A. sylvestris*) и MIC=MBC=0,10/48,20 mg/mL (за *A. panicii*). Етарска уља *A. sylvestris* и *A. panicii* су показала најизраженије деловање против соја *Acinetobacter* sp. (MIC/MBC=0,11/0,22 mg/mL, за *A. sylvestris*) и (MIC=MBC=0,10 mg/mL, за *A. panicii*). Синергистичко деловање етарских уља биљних врста *Angelica sylvestris* и *Angelica panicii* са антибиотиком еритромицином је довело до смањења MIC вредности за еритромицин. Антибактеријска активност метанолних екстраката се кретала у распону од 6,25–100,00 mg/mL за MIC вредности до 12,50–100,00 mg/mL (>100,00 mg/mL) за MBC вредности. Најизраженију антиоксидативну активност показало је етарско уље врсте *Achillea grandifolia* [33,57 $\pm$ 0,07 IC₅₀(mg/mL)-DPPH тест и 2,51 $\pm$ 0,04 mg VitC/g-ABTS тест], а најнижу етарско уље врсте *Hyssopus officinalis* [354,28 $\pm$ 0,01 IC₅₀(mg/mL)-DPPH тест и 0,09 $\pm$ 0,01 mg VitC/g-ABTS тест]. Метанолни екстракт врсте *A. crithmifolia* је показао најјачу антиоксидативну активност [91,40 $\pm$ 0,80% (DPPH тест) 78,55 $\pm$ 0,80 mgAAE/g сувог екстраката (TRP метода), 0,76 $\pm$ 0,80 mmol Fe/g сувог екстраката (FRAP метода), 0,59 $\pm$ 0,00 mmol TE/g сувог екстраката (ABTS тест), 97,70 $\pm$ 1,00 mgRE/g сувог екстраката (укупни флавоноиди), 172,90 $\pm$ 1,20 mgGA/g сувог екстраката (укупни полифеноли)], а најслабију екстракт биљне врсте *A. sylvestris* [35,75 $\pm$ 0,30% (DPPH тест), 17,74 $\pm$ 0,20 mgAAE/ g сувог екстраката (TRP метода), 0,17 $\pm$ 0,00 mmol Fe/g сувог екстраката (FRAP метода), 0,11 $\pm$ 0,00 mmol TE/ g сувог екстраката (ABTS тест), 27,46 $\pm$ 0,20 mgRE/ g сувог екстраката (укупни флавоноиди), 49,64 $\pm$ 0,4 mgGA/g сувог екстраката (укупни полифеноли)].

Закључак. У овој докторској дисертацији су по први пут представљени подаци о антибактеријској активности етарских уља биљних врста *A. sylvestris*, *A. pancicii* и *A. grandifolia*, као и метанолних екстраката *A. pancicii*, *A. grandifolia*, *L. latifolium* и *T. parthenium*. Такође, први пут су изнети подаци и о антиоксидативној активности етарских уља биљних врста *A. sylvestris*, *A. pancicii*, *L. latifolium*, *A. crithmifolia* и *T. parthenium*, као и метанолних екстраката *A. pancicii*, *A. sylvestris*, *A. grandifolia*, *A. crithmifolia* и *H. officinalis*. Испитиване биљне врсте поседују значајан антимикуробни и антоксидативни потенцијал и природни су извор биоактивних једињења. Будућа истраживања требала би требало да се крећу у правцу изоловања чистих доминантних компоненти и утврђивања њиховог антимикуробног и синергистичког деловања у циљу откривања нових антимикуробних агенаса и превазилажења проблема мултирезистентности патогених бактерија на актуелне антибиотике. У светлу тих резултата се се може разматрати и могућност дизајнирања фармаколошких препарата, нарочито када су у питању кожног инфекције.

Датум прихватања теме	18.11.2015.
Датум одбране	
Комисија за оцену и одбрану	1. др Љиљана Чомић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија (председник комисије); 2. др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Микробиологија; 3. др Бојан Златковић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Ботаника; 4. др Весна Станков-Јовановић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, ужа научна област: Аналитичка хемија



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT FOR BIOLOGY AND ECOLOGY

Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac



KEY WORDS DOKUMENTATION

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD Thesis
Author	Stanković Nemanja
Mentor	Prof. dr Tatajana Mihajlov-Krstev
Title	<i>In vitro</i> control of pathogenic bacteria from human material by essential oils and extracts of certain plant species
Language of text	Serbian
Language of abstract	Serbian/English
Country of publication	Serbia
Publication year	2016
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	18 000 Niš, Oblačića Rada street 24/33
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Microbiology
Key words	Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and methanolic extracts; synergistic effects of essential oils and antibiotics; chemical composition of essential oils and methanolic extracts;

	human pathogens
Holding data	Library of University of Kragujevac, Library of the Faculty of Science in Kragujevac, Radoja Domanovića street, 34 000 Kragujevac
Note	No

Abstract

Introduction. During the last several decades one of the leading challenges in medicine is appearance of resistance of pathogenic microorganisms to antibiotic activity. Bacteria showing significant resistance on existing antibiotics include: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., etc. During the activity on pathogenic bacteria, the antibiotics simultaneously show non-selective impact on nonpathogenic bacteria, causing unpredictable genetic changes. In addition to beneficial effects on bacteria, the available antibiotics may also cause adverse effects such as hypersensitivity and immunosuppression. Therefore studies of new agents with antibiotic activity are constantly ongoing. One of the natural sources of such agents are essential oils and extracts of aromatic plants used in traditional medicine as a cure for many infectious diseases and ailments caused by oxidative stress. Therefore the goal of study presented in this dissertation was comparative analysis of chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of eight chosen plant species regularly represented in traditional medicine: *Angelica panicii*, *Angelica sylvestris*, *Laserpitium latifolium*, *Achillea grandifolia*, *Achillea crithmifolia*, *Artemisia absinthium*, *Tanacetum parthenium* and *Hyssopus officinalis*.

Material and methods. The plant material used in this study was collected in 2012 and 2013 in southeastern Serbia. After the plant material was dried, essential oils were isolated by hydro-distillation method using the Clevenger apparatus, while methanol extracts were prepared by alcoholic extraction. The chemical composition of oil was analyzed by GC (gas chromatography) and GC/MS (gas chromatography with mass spectrometry) methods. The total amount of phenols was determined by Folin-Ciocalteu method with slight modifications, while total flavonoids were determined by aluminum chloride (AlCl₃) colorimetric method. The antioxidant activity of essential oils and extracts was determined by ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TRP (total reducing power) and FRAP (Ferric reducing antioxidant power) methods. The antibacterial activity of isolated essential oils, methanol extracts and four antibiotics (ciprofloxacin, doxycycline, gentamicin and erythromycin) was studied by micro-dilution method against 16 bacterial strains collected from swabs of wounds, throat, nose, sputum and aspirate of patients (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*). The synergistic activity of most active oils and the lowest-activity antibiotic (erythromycin), in order to decrease its active concentrations, was

determined by the so-called “checkerboard” method.

Results. The yield of essential oils in studied plant species ranged from 0.05% (in *Angelica sylvestris*) to 0.6% (in *Tanacetum parthenium*), while yields of methanol extracts ranged from 4.7 (in *Achillea crithmifolia*) to 10.1% (in *Artemisia absinthium*). Following components were identified as dominant in essential oils: in *A. crithmifolia* artemisia ketone 31.7%, camphor 25.4% and 1,8-cineol 14.8%; in *A. grandifolia* camphor 45.4%, 1,8-cineol 16.4% and α -thujone 15.1%; in *A. absinthium* sabinene 21.5%, ortho-cymene 19.2% and (z)-epoxyocimene 11.0%; in *H. officinalis* 1,8-cineol 49.1% and isopinocampnone 22.7%; in *L. latifolium* sabinene 47.8% and α -pinene 25.0%; in *T. parthenium* camphor 51.4%, trans-chrysantenil acetate 22.7%, camphene 7.3%; in *A. sylvestris* limonene 75.3% and α -pinene 9.6%; and in *A. panicii* β - phelandrene 54.9%, α -pinene 4.5% and α -phelandrene 4.0%. The antibacterial activity of studied oils was studied in concentrations ranging from 0.10 to 93.20 mg/mL. The strongest antibacterial activity was recorded in essential oils of plant species *A. sylvestris* and *A. panicii*. The range of minimal inhibitory and bactericidal concentrations of these oils was MIC=MBC=0.11/54.40 mg/mL (in *A. sylvestris*) and MIC=MBC=0.10/48.20 mg/mL (in *A. panicii*). The essential oils of *A. sylvestris* and *A. panicii* have shown the most pronounced activity against the strain *Acinetobacter* sp. (MIC/MBC=0.11/0.22 mg/mL, in *A. sylvestris*) and (MIC=MBC=0.10 mg/mL, in *A. panicii*). Synergistic activity of essential oils from species *Angelica sylvestris* and *Angelica panicii* with erythromycin antibiotic led to decrease of MIC values for the erythromycin. The antibacterial activity of methanol extracts ranged from 6.25–100.00 mg/mL for MIC values to 12.50–100.00 mg/mL (>100.00 mg/mL) for MBC values. The most pronounced antioxidant activity was recorded for essential oil of species *Achillea grandifolia* [33.57 $\pm$ 0.07 IC₅₀(mg/mL)-DPPH test and 2.51 $\pm$ 0.04 mg VitC/g-ABTS test], while the lowest activity was recorded for essential oil of species *Hyssopus officinalis* [354.28 $\pm$ 0.01 IC₅₀(mg/mL)-DPPH test and 0.09 $\pm$ 0.01 mg VitC/g-ABTS test]. The methanol extract of species *A. crithmifolia* has shown the strongest antioxidant activity [91.40 $\pm$ 0.80% (DPPH test), 78.55 $\pm$ 0.80 mgAAE/g of dry extract (TRP method), 0.76 $\pm$ 0.80 mmol Fe/g of dry extract (FRAP method), 0.59 $\pm$ 0.00 mmol TE/g of dry extract (ABTS test), 97.70 $\pm$ 1.00 mgRE/g of dry extract (total flavonoids), 172.90 $\pm$ 1.20 mgGA/g of dry extract (total polyphenols)], while the lowest antioxidant activity was recorded for extract of plant species *A. sylvestris* [35.75 $\pm$ 0.30% (DPPH test), 17.74 $\pm$ 0.20 mgAAE/g of dry extract (TRP method), 0.17 $\pm$ 0.00 mmol Fe/g of dry extract (FRAP method), 0.11 $\pm$ 0.00 mmol TE/g of dry extract (ABTS test), 27.46 $\pm$ 0.20 mgRE/g of dry extract (total flavonoids), 49.64 $\pm$ 0.4 mgGA/g of dry extract (total polyphenols)].

Conclusion. This Doctoral Thesis presents the first original data on antibacterial activity of essential oils from plant species *A. sylvestris*, *A. panicii* and *A. grandifolia*, as well as methanol extracts of *A. panicii*, *A. grandifolia*, *L. latifolium* and *T. parthenium*. The paper also includes the first published data on antioxidant activity of essential oils collected from plant species *A. sylvestris*, *A. panicii*, *L. latifolium*, *A. crithmifolia* and *T. parthenium*, as well as methanol extracts of *A. panicii*, *A. sylvestris*, *A. grandifolia*, *A. crithmifolia* and *H. officinalis*. Studied plant species have significant antimicrobial and antioxidant potential as a

natural source of bioactive compounds. The future studies should be directed toward isolation of pure dominant components and determination of their antimicrobial and synergistic activity, with the goal of discovering new antimicrobial agents and overcoming the challenges of pathogenic bacteria with multi-resistance to presently used antibiotics. In light of these results it is also possible to discuss the possibility of designing the pharmacological preparates, particularly in case of skin infections.

Accepted by Scientific Board on	18.11.2015.
Defended on	
Commission	1. dr Ljiljana Čomić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, uža naučna oblast: Mikrobiologija (predsednik komisije); 2. dr Branislava Kocić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, uža naučna oblast: Mikrobiologija; 3. dr Bojan Zlatković, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, uža naučna oblast: Botanika; 4. dr Vesna Stankov-Jovanović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, uža naučna oblast: Analitička hemija

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Немања Станковић
број уписа 11/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
In vitro контрола патогених бактерија пореклом из хуманог материјала деловањем старских уља и екстраката одабраних биљних врста

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

Потпис аутора

у Крагујевцу, 10.5.2016.

Немања Станковић

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Немања Станковић
Број уписа 11/08
Студијски програм Докторске академске студије биологије
Наслов рада In vitro контрола патогених бактерија пореклом из хуманог материјала деловањем старских уља и екстраката одабраних биљних
Ментор проф. др Татјана Михајилов-Крстев

Потписани Немања Станковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу**.

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

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, 10.5.2016.

Немања Станковић

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:
In vitro контрола патогених бактерија пореклом из хуманог материјала деловањем етарских уља и екстраката одабраних биљних врста
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, 10.5.2016. _____



ОБРАЗАЦ 4.

1. Ауторство -

Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство - некомерцијално.

Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално - без прераде.

Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, свом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално - делим под истим условима.

Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство - без прераде.

Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делим под истим условима.

Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.