

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena S. Matejić

**BIOLOŠKA AKTIVNOST ETARSKIH  
ULJA I EKSTRAKATA ODABRANIH  
VRSTA IZ FAMILIJE APIACEAE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena S. Matejić

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL  
OILS AND EXTRACTS OF SELECTED  
SPECIES FROM APIACEAE FAMILY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

**K O M I S I J A:**

---

Dr Petar D. Marin, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu,  
**Mentor**

---

Dr Ana Džamić, docent,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu,  
**Mentor**

---

Dr Marina Soković, naučni savetnik,  
IBI „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

---

Dr Vladimir Ranđelović, redovni profesor,  
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Nišu

Datum odbrane:

Beograd, \_\_\_\_\_

*Ова докторска дисертација урађена је на:*

*Катедри за морфологију и систематику биљка, Биолошког факултета,  
Универзитета у Београду,*

*Институту за лековито биље „Др Јосиф Панчић”,*

*Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић”,*

*Природно-математичком факултету у Нишу.*

*Израда докторске дисертације је реализована у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије бр. 173029.*

*Докторска дисертација рађена је под менторством проф. др Петра Марина и доцента др Ане Цамић, којима исказујем велику захвалност на избору и конципирању теме као и на разумевању и помоћи. Такође, захвалност дугујем и члановима Комисије за оцену докторске дисертације др Марини Соковић и проф. др Владимиру Ранђеловићу.*

*Најлепше се захваљујем и доценту др Татјани Михајилов-Крстев са Природно-математичког факултета у Нишу, на свесрдној помоћи и подрици.*

*Хвала и свим колегицама и колегама са Одсека за биологију и екологију који су на било који начин помогли у изради ове дисертације.*

*Бескрајну захвалност дугујем својој породици, поготово родитељима, на безрезервној подрици. Велику захвалност дугујем и свом момку Срђану на великој љубави. Овај рад не би успео без мојих пријатеља, којима дугујем велико хвала.*

*Јелена Матејић*

## Biolška aktivnost etarskih ulja i ekstrakata odabranih vrsta iz familije Apiaceae

### REZIME

U ovom radu analizirana je biološka aktivnost etarskih ulja i ekstrakata sledećih vrsta familije Apiaceae: *Eryngium serbicum* Pančić, *Seseli pallasii* Besser, *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *libanotis*, *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *intermedium* (Rupr.) P. W. Ball, *Peucedanum officinale* L., *Peucedanum longifolium* W. et K., *Peucedanum aegopodioides* (Boiss.) Vand., *Peucedanum alsaticum* L., *Pastinaca sativa* L., *Heracleum sphondylium* L., *Tordylium maximum* L., *Cachrys cristata* DC. i *Opopanax hispidus* (Friv.) Griseb. Biljni materijal je ekstrahovan metanolom, acetonom i etil-acetatom, dok su vodeni ekstrakti liofilizirani. Etarska ulja navedenih vrsta i odabrani ekstrakti su testirani sa aspekta antimikrobne i antioksidativne aktivnosti. Kao pozitivne kontrole korišćeni su komercijalni antibiotici i antimikotici, a u testovima za utvrđivanje antioksidativne aktivnosti BHA i vitamin C. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata testirana je na: Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* i *Enterobacter cloacae*) i Gram-pozitivne bakterije (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* i *Staphylococcus aureus*), kao i na mikromicete (*Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*, *Trichoderma viride* i *Candida albicans*). Kompozicija etarskih ulja je analizirana korišćenjem GC i GC/MS metoda. Metoda mikrodilucije na mikrotitracionim pločama je korišćena za testiranje antimikrobne aktivnosti. Određivane su minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije (MIC i MBC/MFC). DPPH i ABTS analize, kao i ukupan sadržaj fenola i flavonoida, su korišćene za određivanje antioksidativne aktivnosti.

Etarsko ulje *Eryngium serbicum* je bilo najefikasniji antimikrobni agens, a slede ga ulja vrste roda *Peucedanum*, dok je etarsko ulje *Seseli pallasii* imalo najnižu antimikrobnu aktivnost. Acetonski i etil-acetatni ekstrakti su imali bolji antimikrobni potencijal od metanolnih i vodenih ekstrakata. *Salmonella typhimurium* je najosetljivija bakterija, dok je *Listeria monocytogenes*, pokazala dobru otpornost na ispitivana ulja i

ekstrakte. Rezultati testiranih gljiva pokazuju da je *Aspergillus ochraceus* bila najosetljivija, dok je *Candida albicans* bila najrezistentnija.

Vodeni ekstrakti su bili najefikasniji u neutralizaciji DPPH radikala, dok su acetonski ekstrakti bili najefikasniji kod ABTS testa. Ekstrakti *Peucedanum officinale* su pokazali najbolju antioksidativnu aktivnost.

**Ključne reči:** Apiaceae, etarska ulja, ekstrakti, GC/MS, antimikrobna aktivnost, antioksidansi

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Morfologija, fitohemija i sistematika biljaka

**UDK:** 582.794.1: [581.135.5 + 678. 048 + 547.56] (043.3)

## Biological activities of essential oils and extracts of selected Apiaceae species

### ABSTRACT

In this work the biological activity of essential oils and extracts from following Apiaceae species was analyzed: *Eryngium serbicum* Pančić, *Seseli pallasii* Besser, *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *libanotis*, *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *intermedium* (Rupr.) P. W. Ball, *Peucedanum officinale* L., *Peucedanum longifolium* W. et K., *Peucedanum aegopodioides* (Boiss.) Vand., *Peucedanum alsaticum* L., *Pastinaca sativa* L., *Heracleum sphondylium* L., *Tordylium maximum* L., *Cachrys cristata* DC., *Opopanax hispidus* (Friv.) Griseb. Herbal samples, were extracted with methanol, acetone and ethyl-acetate, while aqueous extracts were dried by freeze-dryer. Essential oils of above species, and selected extracts were evaluated for their antimicrobial and antioxidant activities. As a positive control commercial antibiotics and fungicides were used, while BHA and Vitamin C were used in antioxidant test. The antimicrobial activity of essential oils and extracts was investigated against: Gram (-) bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter cloacae*) and Gram (+) bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus*), and micromycetes (*Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*, *Trichoderma viride*, *Candida albicans*). The volatile constituents were analyzed using GC and GC/MS procedures. Microdilution method on microtitration plates was used for antimicrobial assay. Minimum inhibitory and minimum antibacterial/antifungal concentrations (MIC and MBC/MFC) were determined. DPPH and ABTS assay and total phenol and flavonoid content were used for antioxidant activity determination.

Essential oil of *Eryngium serbicum* was the most effective antimicrobial agents, followed by *Peucedanum* species, while *Seseli pallasii* essential oil showed the lowest antimicrobial activity. Acetone and ethyl-acetate extracts showed better antimicrobial potential than methanol and aqueous extracts. *Salmonella typhimurium* were the most susceptible bacteria, while *Listeria monocytogenes*, showed good resistance to all of oils

and extracts investigated. The results show that the tested micromycetes *Aspergillus ochraceus* was the most sensitive, while *Candida albicans* was the most resistant.

Aqueous extracts were the most effective DPPH radical scavengers, while acetone extracts were the most effective at ABTS test. Extracts of *Peucedanum officinale* was with highest antioxidant activity.

**Key words:** Apiaceae, essential oils, extracts, GC/MS, antimicrobial activity, antioxidants.

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Morphology, phytochemistry and systematics of plants

**UDK:** 582.794.1: [581.135.5 + 678. 048 + 547.56] (043.3)



## SKRAĆENICE

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)  
BHA – 3-tert-butil-4-hidroksianizol  
DAD – (diode array detector) – višekanalni UV detektor  
DMSO – dimetil sulfoksid  
DPPH – 2,2-difenil, 1-pikril hidrazil  
EC<sub>50</sub> – koncentracija koja dovodi do smanjenje apsorpcije za 50%  
EtOAc – etil-acetat  
FC – (Folin-Ciocalteu reagent) – Folin-Kirkolov reagens  
FID – (flame ionisation detector) – plameno jonizujući detektor  
GAE – galna kiselina  
GC – gasna hromatografija  
GC-MS – gasna hromatografija sa spektrometrijom masa  
H<sub>2</sub>O – voda  
KIE – Kovačev (retencioni) indeks eksperimentalno određen  
KIL – Kovačev (retencioni) indeks literaturni podatak  
MA – Malt – agar  
MH – Müller-Hinton bujon  
MeOH – metanol  
MBC – minimalna baktericidna koncentracija  
MFC – minimalna fungicidna koncentracija  
MIC – minimalna inhibitorna koncentracija  
MS – masena spektrometrija  
n.i. – nije identifikovano  
Qu – kvercetin  
ROS – (reaktive oxygen species) – reaktivne kiseonične vrste  
RNS – (reaktive nitrogen species) – reaktivne azotne vrste  
UV – (ultraviolet) – ultraljubičasto zračenje  
Vitamin C – askorbinska kiselina

## SADRŽAJ

<b>1.UVOD</b> .....	1
1.1. Opšte karakteristike familije Apiaceae .....	2
1.1.1. Opšte karakteristike ispitivanih biljaka .....	3
1.2. Etarska ulja .....	21
1.2.1. Opšte karakteristike etarskih ulja .....	21
1.2.1.1. Priroda i rasprostranjenost etarskih ulja .....	21
1.2.1.2. Lokalizacija etarskih ulja .....	22
1.2.1.3. Fizička svojstva etarskih ulja.....	23
1.2.1.4. Hemijski sastav etarskih ulja .....	23
1.2.2. Biološka funkcija etarskih ulja .....	29
1.2.3. Varijabilnost sadržaja i sastava etarskih ulja i njihov taksonomski značaj .....	29
1.3. Ekstrakti.....	32
1.4. Polifenoli .....	34
1.4.1. Opšte karakteristike polifenola .....	34
1.4.1.1. Rasprostranjenost u prirodi i lokalizacija polifenola.....	37
1.4.2. Biološka funkcija polifenola.....	37
1.4.3. Taksonomski značaj polifenola .....	39
1.5. Mikroorganizmi .....	40
1.5.1. Opšte karakteristike mikroorganizama .....	40
1.5.2. Patogeni mikroorganizmi .....	40
1.5.3. Uloga mikroorganizma u infektivnom procesu .....	42
1.5.4. Opis testiranih mikroorganizama.....	44
1.6. Antimikrobna aktivnost .....	62
1.6.1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata .....	62
1.6.1.1. Mehanizam antimikrobnog delovanja .....	63
1.6.2. Antifungalna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata .....	66
1.7. Antioksidativna aktivnost .....	68
1.7.1. Slobodni radikali, reaktivni kiseonik i azotne vrste .....	69
1.7.2. Antioksidansi .....	71
1.7.3. Oksidativni stres i zdravlje ljudi .....	73

1.8. Biološka aktivnost .....	77
<b>2. CILJ RADA</b> .....	82
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	83
3.1. Materijal.....	83
3.1.1. Biljni material .....	83
3.1.2. Izolovanje etarskog ulja.....	84
3.1.3. Dobijanje ekstrakata .....	84
3.1.4. Hemikalije i reagensi .....	84
3.1.5. Tretirane bakterije.....	85
3.1.6. Tretirane mikromicete .....	85
3.2. Metode .....	87
3.2.1. Metode za analizu etarskih ulja .....	87
3.2.1.1. GC i GC-MS .....	87
3.2.2. Metode za analizu ekstrakata.....	88
3.2.3. Metode za određivanje polifenola .....	88
3.2.3.1. Određivanje ukupnih fenola kolorimetrijski reakcijom po Folin-Ciocalteu .....	88
3.2.3.2. Određivanje ukupnih flavonoida kolorimetrijski .....	88
3.2.4. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti .....	89
3.2.4.1. DPPH metoda .....	89
3.2.4.2. ABTS metoda .....	90
3.2.5. Mikrodiluciona metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti <i>in vitro</i> .....	91
3.2.5.1. Testiranje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata .....	91
3.2.5.2. Testiranje antimikrobne aktivnosti ekstarakata .....	92
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	93
4.1. Analiza hemijskog sastava etarskih ulja.....	94
4.2. Rezultati antibakterijske i antifungalne aktivnosti .....	100
4.2.1. Usporedna analiza antibakterijske i antifungalne aktivnosti testiranih etarskih ulja.....	100

4.2.2. Uporedna analiza antibakterijske i antifungalne aktivnosti testiranih ekstrakata .....	104
4.3. Uporedna analiza antioksidativne aktivnosti .....	121
4.3.1. DPPH test .....	121
4.3.2. ABTS test .....	138
4.3.3. Određivanje sadržaja polifenola .....	144
4.3.4. Određivanje sadržaja flavonoida .....	151
4.4. Opšta diskusija.....	157
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>160</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>164</b>

## 1. UVOD

Familija Apiaceae Lindl. (=Umbelliferae Juss.) je jedana od najviše istraživanih familija cvetnica. Vrste koje pripadaju ovoj familiji se najčešće koriste u ishrani (šargarepa, paškanat, celer) i kao začini (korijander, anis, kim, peršun, mirođija). Karakterističan ukus i miris ovih biljaka potiče od isparljivih jedinjenja koja se nalaze u plodovima i listovima, što im omogućuje široku primenu kako u kulinarstvu, tako i u medicinske svrhe. Familija takođe obuhvata široko rasprostranjene korovske, kao i otrovne vrste, uključujući ozloglašeni otrov kukute koji se koristio još u staroj Grčkoj (najpoznatiji događaj je vezan za „pehar kukute" koji su Sokratu dali da ispije). Srećom, takve zloupotrebe otrovnih biljaka su retke i iz tih razloga vrste koje pripadaju familiji Apiaceae se izdvajaju kao vrste od velikog ekonomskog značaja. Uprkos svojoj dugoj taksonomskoj istoriji koja datira još od Morison-a (1672) kao i najranije sistematske studije (Constance, 1971), ova familija i dalje čeka modernu klasifikaciju. Najnovija istraživanja familije (Pimenov i Leonov, 1993), kao i adaptacije vekovima starog sistema Drude (1898), kritikovane su zbog upotrebe loše definisanih dijagnostičkih karaktera. Nekoliko alternativnih klasifikacija su takođe predložene (de Candolle, 1830, Bentham, 1867; Koso-Poljansky, 1916; Cerceau-Larrival, 1962), ali ni jedna nije opšte prihvaćena. Molekularni pristup je mnogo doprineo razumevanju evolucionih odnosa vrsta u okviru familije Apiaceae. Filogenetski odnosi u okviru familije u kojima su analizirane hloroplasne DNA sekvence (cpDNA) (Downie, Katz-Downie, Cho, 1996; Plunkett, Soltis, Soltis, 1996; Downie i sar., 1998), cpDNA restrikcioni fragmenti (Plunkett i Downie, 1999), kao i nuklearne ribozomalne DNK interne transkripcione sekvence (ITS) (Downie i Katz-Downie, 1996; Downie i sar., 1998; Katz-Downie i sar., 1999) su pokazali da su potfamilije Saniculoideae i Apioideae, monofiletske, dok je potfamilija Hydrocotyloideae polifiletska.

## 1.1. Opšte karakteristike familije Apiaceae

Vrste koje pripadaju familiji Apiaceae su jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, vrlo retko polužbunovi. Stabljika je uglavnom sa šupljim internodijama. Iz razloga što imaju jače razvijen kolenhim mogu dostići visinu do 3 m i 5 cm u prečniku. Listovi naizmenično, ređe naspramno raspoređeni, obično krupni, naročito prizemni i pri osnovi stabljike, retko celi ili usečeni, najčešće jednom ili više puta perasto deljeni na različite načine, tako da isecci mogu biti različitog oblika, nekad sasvim tanki, končasti. Lisna drška ili liska pri osnovi prelazi u lisni rukavac, koji obuhvata stabljiku. Cvetovi su sitni, dvoplani, retko jednopolni, većinom zračne simetrije (aktinomorfni), ponekad samo po obodu štita, nalaze se i zigomorfni, grupisani u proste štitove i tada imaju oblik glavica, a mnogo češće u složene štitove, gde se bočne grane prvog reda ne završavaju cvetovima, već prostim štitovima. U cvasti manji ili veći broj priperaka može biti razvijen ispod glavnog štita i obrazuje omotač involukrum, a ispod štitića involucelum. Cvetovi se sastoje iz 5 čašičnih, 5 kruničnih listića, 5 prašnika i 2 oplodna listića. Čašica je najčešće slabo razvijena, većinom je u obliku petozubog obruba na gornjem delu plodnika ili je gotovo neprimetna. Krunični listići su slobodni, po obodu dvorežnjeviti ili usečeni, ređe celi, vrlo često su vrhovi kruničnih listića prema unutrašnjosti povijeni, tako da ponekad izgleda kao da su iz 3 režnja sastavljeni; kod zigomorfni cvetova su nejednaki, veći su prema spoljnoj strani cvasti, boje su bele, žute ili crvene. Prašnici su slobodni. Tučak sa dvookim, retko jednookim, podcvetnim plodnikom sa po jednim semenim zametkom u svakom okcu. Na plodniku se često nalaze nektarije u obliku mesnatog jastučića (*discus*) ili manje više istaknutog proširenja (*stylopodium*), iz kojih se izdižu 2 stubića, često sa lepljivim žigovima (**Slika 1.1**). Plod je šizokarpijum. Zreo plod se raspada u dve jednosemene merikarpije, koje su izvesno vreme vezane za končusat izraštaj, nosač ploda - karpofor. Plodići su sa unutrašnje, ventralne strane, gde se međusobno dodiruju, većinom pljosnati, a na suprotnoj, dorzalnoj (leđnoj), ispupčeni. Na svakom plodiću nalaze se obično po 5 glavnih uzdužnih rebara (*juga primaria*), u kojim se nalaze provodni snopići i to tri leđna i dva bočna, a često se između ovih javljaju i sporedna rebra (*juga secundaria*). Na gornjem kraju mogu se nalaziti ostaci čašice i stubića. U zidu plodnika (perikarpu) svuda okolo ili između glavnih rebara u brazdama (*vittae vallecularis*), ređe

ispod glavnih rebara (*vittae intrajugalis*), nalaze se kanali sa etarskim uljem. Ponekad se javljaju i na ventralnoj strani (*vittae commissuralis*). Seme je vrlo različitog oblika i građe i često prirasta za zid plodnika. Većina biljaka ove familije od aktivnih supstanci sadrže: etarska ulja, kumarine i furokumarine. Familija Apiaceae obuhvata oko 300 rodova sa oko 3000 vrsta rasprostranjenih po čitavoj Zemlji, uglavnom u severnoj umerenoj zoni. U Srbiji familija Apiaceae je zastupljena sa 53 roda i 138 vrsta (Nikolić, 1973).

Cvetna formula:  $* K_5 C_5 A_5 G_5$



Slika 1.1. Cvetni dijagram

### 1.1.1. Opšte karakteristike ispitivanih biljaka

**Subfam. *Saniculoideae* Drude**

**Rod *Eryngium* L.**

Jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje biljke. Listovi celi, prosto ili perasto deljeni. Reznjevi se završavaju oštrom bodljom. Cvetovi na vrlo kratkim peteljkaama ili sedeći u zbijenoj prostoj štitastoj cvasti glavičastog oblika. Listići involuceluma linearni ili bodljikasti. Čašični listići sa bodljom. Krunični listići na vrhu usečeni. Plod jajast, obao, sa ljuspama ili bradavičast (Nikolić, 1973). Poznato je da vrste koje pripadaju ovom rodu sadrže acetilene, kumarine, flavonoide i triterpenske saponine (Erdelmeier i Sticher, 1986). Rod obuhvata oko 220 vrsta rasprostranjenih na severnoj i južnoj hemisferi. U Srbiji raste 5 vrsta (Nikolić, 1973).

### ***Eryngium serbicum* Pančić - srpski kotrljan**

Višegodišnja biljka, visine 40-70 cm. Stabljika u gornjem delu sa kratkim granama. Dok je mlada biljka je zelene boje, kasnije je plavičasta (**Slika 1.1.1**). Prizemni listovi na dugačkim drškama, prstasto deljeni na 5-7 linearnih, vrlo dugih režnjeva, po obodu sa bodljama čija je nervatura paralelna; listovi na stabljici na kratkim drškama, prstasto usečeni na 5-7 lancetastih, bodljikavih listića; gornji listovi sedeći vrlo mali. Cvetovi skupljeni u cvast glavičastog oblika veličine 1-1.5 cm. Listići involukruma veličine 1-4 cm, linearno zašiljeni, često pri osnovi prošireni, sa 1-2 para bodlji; listići involuceluma uzano linearni, kruti, sa strane imaju po 1-3 bodlje, duži od cvetnih glavica. Krunični listići plavičasti. Čašični listići veličine 2-3 mm, jajasto lancetasti, kratko ušiljeni.



**Slika 1.1.1. *Eryngium serbicum* Pančić**

**Stanište:** Na sunčanim, suvim, kamenitim mestima.

**Opšte rasprostranjenje:** Nalazi se samo u Srbiji. Biljka je predstavljena kao transregionalni endemit (Chater, 1968; Stevanović i sar., 2003).

**Rasprostranjenje u SR Srbiji:** Kragujevac (Dobrača), Kopaonik, Cerovak (Kraljevo), Stolovi (Ibarska dolina), okolina Niša, Pirot (Osmakovo, Crnoklišta) (Nikolić, 1973).

**Upotreba:** Za sada nije zabeležena upotrebna vrednost.



## Subfam. Apioideae Drude

### Rod *Seseli* L.

Višegodišnje biljke. Cvetovi hermafroditni i muški, nalaze se u složenom štitu. Čašica sa 5 zubaca. Involukruma nema ili je od više listića. Listići involuceluma brojni. Krunični listići beli, ružičasti ili žuti. Plod gotovo obao, jajast ili duguljast. Plodići sa 5 jasno istaknutih rebara. Brazde sa po 1-3 kanala sa etarskim uljem. Rod obuhvata oko 55 vrsta, rasprostranjenih uglavnom u Evropi. U Srbiji raste 10 vrsta (Nikolić, 1973).

#### *Seseli pallasii* Besser (uključujući *S. varium* Trev.)

Najčešće dvogodišnja zeljasta biljka sa vretenasto razgranatim rizomom na gornjem delu sa končastim ostacima ranijih listova. Stabljika uspravna, visine 30-120 cm, okrugla, sitno izbrazdana, već od osnove razgranata, u gornjem delu bez listova (Ball, 1968). Listovi goli, donji na žljebovitoj dršci, dva ili više puta perasto deljeni, režnjevi linearni, šiljati, dužine 5-12 mm, široki 1 mm; srednji i gornji sedeći, linearni, sa izduženim rukavcem. Štitovi prilično veliki, sa 15-25 golih, nejednakih zrakova. Involukruma nema ili je od 1 listića. Listići involuceluma brojni, lancetasti, zašiljeni, po obodu opnasti. Krunični listići mali, okrugli, beli. Plod izdužen ili izduženo elipsoidnog oblika, dužine oko 3.5 mm, sa oštro istaknutim rebrima. Brazde sa 1 kanalom sa etarskim uljem (**Slika 1.1.2**).



**Slika 1.1.2.** *Seseli pallasii* Besser

**Stanište:** Na suvim, kamenitim pašnjacima i livadama, peskovitim nanosima, u šikarama, pored puteva, na nasipima (Nikolić, 1973).

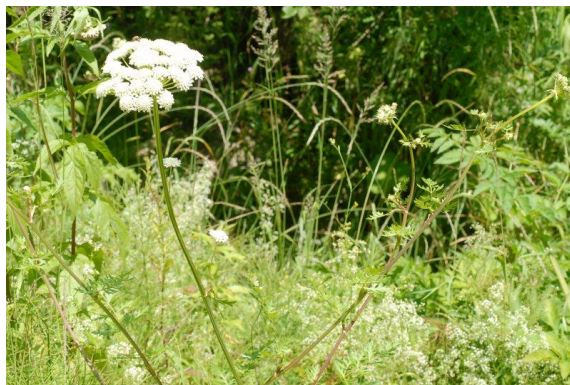
**Opšte rasprostranjenje:** Severni deo Italije, Češke i Slovačke, ka istočnoj i centralnoj Ukrajini (Ball, 1968).

**Rasprostranjenje u SR Srbiji:** Istočna Srbija: Đerdapska klisura, Stol, Ozren, Niš (Prosek), Pirot (Bela Palanka, Basara, Vidlič), Suva planina, Vranje (Nikolić, 1973).

**Upotreba:** Pokazano je da ekstrakt biljke *S. pallasii* pokazuje toksično i inhibitorno dejstvo na rast larve *Spodoptera littoralis*, što je jako bitno jer ova vrsta leptira predstavlja velike štetočine koje uništavaju povrće, voće i useve (Pavela, 2011).

### ***Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *libanotis* - zdravinjak**

Prizemni listovi su 2 do 3 puta perasto deljeni, režnjevi su linearni, srpasti i tanki (Ball, 1968) (**Slika 1.1.3**). Cveti od jula do septembra i pčelama daje malo nektara i polena (Umeljić, 2003).



**Slika 1.1.3. *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *libanotis***

**Stanište:** U planinskom regionu na kamenjarima, stenovitim padinama, obraslim padinama, suvim krečnjačkim osulinama, na pr. u zajednicama *Lamieto-Brometum erecti*, *Junipereto-Salicetum silesiaca*, *Piceetum excelsae serbicum* i dr. (Nikolić, 1973).

**Opšte rasprostranjenje:** Ova vrsta je rasprostranjena u istočnoj, centralnoj i delimično južnoj Evropi, a može se naći i na severu Švedske (Ball, 1968).

**Rasprostranjenje u Srbiji:** Tara (Derвента), Mokra gora (Gradina), Medvednik, istočna Srbija - Đerdapska klisura (Golubački grad), Jastrebac (Pogled), Pirot (Basara, Vidlič), Topli Do (Mrtvi most).

**Upotreba:** Poznat je hemijski sastav etarskog ulja nadzemnog dela biljke u cvetu ( $\beta$ -elemen (21.5-28.0%),  $\alpha$ -selinen (16.5-19.5%), seskviterpenski alkoholi (18.5-28.0%),  $\alpha$ -pinen, kamfen, *p*-cimen, kariofilen, kariofilenoksid), međutim nije zabeležena njegova upotrebna vrednost (Jančić i sar., 1995).

***Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *intermedium* (Rupr.) P. W. Ball (Syn. *Libanotis intermedia* Rupr.)**

Prizemni listovi su 1 do 2 puta perasto deljeni, režnjevi su ovalni, grubo nazubljeni ili usečeni (**Slika 1.1.4**).



**Slika 1.1.4. *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *intermedium* (Rupr.) P. W. Ball**

**Opšte rasprostranjenje:** Ova vrsta je rasprostranjena u istočnoj i centralnoj Evropi (Ball, 1968).

**Upotreba:** Za sada nije zabeležena upotrebna vrednost.

## **Rod *Peucedanum* L.**

Višegodišnje biljke sa više puta tročlanim ili perasto deljenim listovima. Rizom ponekad repasto zadebljao. Čašica često sa 5 zubaca. Krunični listići beli, crvenkasti, zelenkasti, žućkasti ili žuti, ređe crveni. Stubići mali najčešće savijeni. Plod spljošten, širokog elipsoidnog oblika ili ponekad okrugao, sa širokim obodom. Brazde sa 1-3 kanala, na ventralnoj strani 2-6 kanala (Nikolić, 1973). Prema farmakološkim istraživanjima pokazano je da su vrste ovog roda bogate furanokumarinima i piranokumarinima. Neki od ovih jedinjenja pokazuju antimikrobnu i citotoksičnu aktivnost (Schillaci i sar., 2003). Rod obuhvata oko 120 vrsta rasprostranjenih u Evroaziji i Africi. U Srbiji raste 14 vrsta (Nikolić, 1973).

### ***Peucedanum officinale* L. (= *Selinum peucedanum* Web.) - siljevina, devesilje**

Višegodišnja biljka sa valjkasto vretenastim rizomom, na čijem se gornjem delu nalaze končasti ostaci. Stabljika visine 60-200 cm, uspravna, glatka, okrugla, tanko izbrazdana, obrasla listovima, u gornjem delu razgranata. Prizemni listovi 4-6 puta trojno perasto deljeni, na dugačkim drškama, sa izduženim rukavcem. Režnjevi linearno lancetasti, dužine 5-10 cm, širine 1.5-2.5 mm, na vrhu izduženo zašiljeni, sa jednim srednjim i 2 bočna nerva. Gornji listovi mali, sa uzanim rukavcem. Štitovi veliki, sa 10-40 gotovo jednakih zrakova. Štitići sa većim brojem cvetova, na dužim drškama. Involukruma nema. Involucelum od većeg broja linearno-končastih listića. Zupci na čašici izduženo trouglasti. Krunični listići bledo-žuti, široko jajastog oblika. Plod elipsoidan ili obrnuto jajast, dužine 5-10 mm, širine 3.5-5.5 mm. Krilati nabor na obodu plodića širine oko polovine ploda. Brazde sa po 1 kanalom sa etarskim uljem, na ventralnoj strani 2 kanala (**Slika 1.1.5**).

**Stanište:** Po livadama, pašnjacima, na ivicama šuma, proplancima, suvim padinama, šikarama, pored puteva.

**Opšte rasprostranjenje:** Evropa, zapadna Azija. - Pontsko-mediteranski (srednjoevropski) florni elemenat.

**Rasprostranjenje u SR Srbiji:** Vojvodina - Srem, Fruška gora; uža Srbija - Zlatibor, Kragujevac (okolina), Veliki Krš (Bor), Niš (okolina) (Nikolić, 1973).



**Slika 1.1.5. *Peucedanum officinale* L.**

**Upotreba:** Nekada je u medicini jako upotrebljivan zgusnut sok ove biljke protiv hipohondrije, epilepsije, paralize, protiv katara pluća, protiv grčeva u materici (Petrović, 1883; Sarić, 1989). Pokazano je da ova vrsta ima i antiinflamatornu aktivnost, što nam pruža mogućnost njenog korišćenja u terapijske svrhe (Sevastre i sar., 2007).

#### ***Peucedanum longifolium* W. et K. - siljevina, devesilje**

Višegodišnja biljka sa vretenastim, zadebljalim rizomom, na čijem se gornjem delu nalaze končasti ostaci. Stabljika uspravna, gola, tanko izbrazdana, obrasla listovima, razgranata u gornjem delu. Donji listovi na drškama, sa uzanim rukavcima, 4-6 puta na tri dela izdeljeni, krupni, trouglasti, dužine oko 40 cm, pri vrhu stabljike reducirani u cilindričan rukavac. Režnjevi gotovo končasti, dužine 3-7 cm, širine do 1 mm, krupni, izduženo zašiljeni. Štitovi veliki, sa 15-30 zrakova različite dužine. Cvetova veliki broj. Involukruma nema ili je sastavljen od 1-2 linearna listića. Involucelum sačinjava veći broj končastih listića. Zupci na čašici mali. Krunični listići žuti, dužine oko 1 mm, jajasto-okrugli. Plod elipsoidan ili jajast, dužine 7-9 mm, širine 4-4.5 mm, na kraćoj ili dužoj peteljci. Brazde sa po 1 kanalom sa etarskim uljem, na ventralnoj strani po 2 kanala (**Slika 1.1.6**).

**Stanište:** Na krečnjačkim stenama.

**Opšte rasprostranjenje:** Severni deo Balkanskog poluostrva, Rumunija.



**Rasprostranjenje u SR Srbiji:** Đerdapska klisura (Golubački grad, Pesača, Miroč - Štrbac), Rtanj, Leskovik, Pleš, Suva planina, Knjaževac (Ulj kamen), Pirot (Rakoš, Babušnica), Kraljevo (Metikoš), Zlatibor (Nikolić, 1973).



**Slika 1.1.6. *Peucedanum longifolium* W. et K.**

**Upotreba:** Za sada nije zabeležena upotrebna vrednost.

***Peucedanum aegopodioides* (Boiss.) Vand. (Syn. *Peucedanum serbicum* Petrović)**

Višegodišnja biljka sa debelim dugačkim rizomom. Stabljika uspravna, gola, šuplja, izbrazdana, razgranata. Listovi dva puta trostruko perasto deljeni, režnjevi krupni, po obodu zupčasti, na vrhu zašiljeni, na dugačkim drškama; donji listovi na dugačkim drškama, režnjevi pri dnu zaokruženi, jajasti, na drškama, po obodu oštro testerasti; srednje lišće na kraćoj dršci, režnjevi objajasto klinasti ili duguljasti, po obodu celi ili krupno nazubljeni; gornji mnogo manji, perasti ili trodelni, oštro nazubljeni. Štitovi sa 10-25 maljavih zrakova različite dužine. Involukrum od 3-6 lancetastih zašiljenih listića. Involucelum od većeg broja linearnih šiljatih listića. Cvetovi beli ili ružičasti. Čašični listići vrlo sitni. Plod eliptičan ili široko duguljast, pri

dnu srcast, na vrhu zaokružen, po obodu krilat. Krila skoro širine ploda. Brazde sa po jednim kanalom sa etarskim uljem, na ventralnoj strani 2 kanala (Nikolić, 1973). Cveta od jula do septembra i pčelama daje malo nektara. Razmnožava se semenom (**Slika 1.1.7**) (Umeljić, 2002).

**Stanište:** U planinskim predelima obraslim šumom, naročito pored potoka i reka, u zajednici *Fagetum montanum serbicum* i drugim.

**Opšte rasprostranjenje:** Istočni deo Balkanskog poluostrva.

**Rasprostranjenje u SR Srbiji:** Jugoistočna Srbija (Stara planina, Suva planina, Jelašnica, Pirot, Ostrožub, Vranje); centralna Srbija (Požega, Gledičke planine); Kosovo (Žljeb) (Nikolić, 1973).



**Slika 1.1.7. *Peucedanum aegopodioides* (Boiss.) Vand.**

**Upotreba:** Za sada nije zabeležena upotrebna vrednost.

***Peucedanum alsaticum* L. (*Petroselinum alsaticum* Rchb.) - siljevina  
žučkasta**

Višegodišnja biljka sa zadebljalim, razgranatim rizomom, na čijem se gornjem delu nalaze končasti čuperci. Stabljika uspravna, gola, visine 30-180 cm, šuplja, u donjem delu okrugla, izbrazdana, u gornjem rebrasta, zelene ili ljubičaste boje razgranata, ponekad još od osnove. Listovi zeleni, na naličju sivozeleni. Prizemni i donji listovi na dugačkim drškama, veliki i široki, 2-4 puta perasto deljeni; režnjevi široko jajasti, perasto usečeni do perasto deljeni, pri osnovi klinasti, vršni jajasti do linearno lancetasti, tupi do šiljati, po obodu nazubljeni. Srednji i gornji listovi sedeći, sa

izduženim rukavcem, 1-2 puta perasto deljeni, sa užim isečcima, vršni listovi reducirani u rukavac. Štitova veći broj, sa 10-20 golih, ređe sa unutrašnje starne rapavih, zrakova dužine 1.5-3 mm. Involukrum i involucelum sačinjavaju 4-8 lancetastih listića. Zupci na čašici mali, lancetasti. Krunični listići blede žuti, eliptičnog oblika, spljošteni, dužine 3-5 mm, širine 2-3.5 mm. Krila na plodu širine 0.5 mm. Plodići na poprečnom preseku elipsoidnog oblika. Brazde sa po jednim kanalom sa etarskim uljem, dok se sa ventralne strane nalaze po dva kanala (**Slika 1.1.8**).

**Stanište:** Na suvim obraslim padinama, kamenjarima, liticama, šikarama, svetlim šumama, nasipima, pored puteva.

**Opšte rasprostranjenje:** Evropa, srednja i južna Rusija, Kavkaz, Sibir (oblast Altaja). - Kontinentalno (evroazijski) florni elemenat.

**Rasprostranjenje u SR Srbiji:** Vojvodina (Fruška gora), uža Srbija (Beograd, Đerdapska klisura, Kragujevac, Zaječar, Knjaževac, Niš, Vranje) (Nikolić, 1973).



**Slika 1.1.8. *Peucedanum alsaticum* L.**

**Upotreba:** Sve biljke ovog roda cene u narodnoj medicini kao sredstvo za jačanje (otuda im i ime "siljevina"), jer svojom gorčinom i etarskim uljem (terpeni) pojačavaju lučenje želudačnog soka, povećavaju apetit, olakšavaju varenje hrane i uopšte povoljno deluju na organizam (Tucakov, 1986).



## **Rod *Pastinaca* L.**

Dvogodišnje ili višegodišnje biljke sa perasto ili dvostruko perasto deljenim listovima. Cvetovi hermafroditni, nalaze se u složenim štitovima. Krunični listići žuti, ređe ružičasti. Plod spljošten, po obodu krilat. Brazde sa po 1 kanalom sa etarskim uljem, na ventralnoj strani 2 kanala. Rod obuhvata oko 15 vrsta rasprostranjenih u Evropi i Aziji. U Srbiji rastu 2 vrste.

### ***Pastinaca sativa* L. - pastrnjak, paškanat**

Dvogodišnja biljka sa vretenastim, ponekad repasto zadebljalim beličastim korenom. Stabljika visine 30-100 cm, šuplja, snažna, okrugla, rebrasta, izbrazdana, maljava ili gola, najčešće razgranata. Listovi jednostavno deljeni, sa 2-7 pari režnjeva, goli ili dlakavi. Režnjevi sedeći, jajasti ili lancetasti, tupi ili zašiljeni, pri osnovi sa 1-2 isečka, ređe perasto usečeni, po obodu grubo nazubljeni, zupci šiljati; vršni režnjevi sa tri isečka. Prizemni listovi na drškama, sa proširenim kratkim rukavcem; gornji gotovo reducirani u rukavac. Vršni štit sa 5-20 maljavih ili golih zrakova. U štitovima cvetovi i plodovi na dugačkim peteljka. Involukruma i involuceluma nema ili su od 1-2 listića, koji opadnu. Krunični listići jajasti, žuti, dužine oko 0.5 mm, širine oko 1 mm. Plod mrkožute boje, široko elipsoidnog oblika, dužine 5-7 mm, širine 3-5.5 mm, sa uskim krilima po obodu, širokim oko 0.5 mm. Stubići manje više savijeni, približno iste dužine kao stilopodijum (**Slika 1.1.9**).

**Stanište:** Raste gotovo svuda na suvim i umereno vlažnim livadama, pokraj puteva, na međama, nasipima, kamenjarima. Zapažena u zajednici *Arrhenatherum elatius*.

**Opšte rasprostranjenje:** Evropa, Kavkaz, Sibir; gaji se u Severnoj i Južnoj Americi, Australiji, Novom Zelandu (Nikolić, 1973).

**Rasprostranjenje u SR Srbiji:** Rasprostranjena. Raste kao česta kulturna biljka (Sarić, 1989).



**Slika 1.1.9. *Pastinaca sativa* L.**

**Upotreba:** Poznat je hemijski sastav etarskog ulja ploda (miristicin (1.2-64.2%),  $\gamma$ -palmitolakton (5.0-21.4%), *trans*- $\beta$ -ocimen (9.8-29.1%), *cis*- $\beta$ -ocimen (6.8-13.1%), *trans*- $\beta$ -farnezen (1.4-24.5%),  $\alpha$ -tujen (0.1-0.3%),  $\beta$ -pinen (0.1-0.4%), mircen (0.4-1.2%), limonen (0.1-0.3%), terpinolen (0.4-1.4%), kariofilen (0.4-8.1%)), i kao takvo se koristi u prehrambenoj industriji (Jančić i sar., 1995). Sveža biljka se upotrebljava u ishrani, kao začin, u farmaceutskoj industriji, narodnoj medicini (Nikolić, 1973). U narodnoj medicini se koristi kao začin i lek za izazivanje apetita, boljeg varenja, protiv grčeva u crevima i kao diuretik. Plod je gorak aromatik; povećava mlečnost. Pored ploda (*Pastinacae fructus*), koristi se koren (*P. radix*) i ređe list (*P. folium*) (Tucakov, 1986).

## **Rod *Heracleum* L.**

Dvogodišnje ili višegodišnje biljke, sa perasto usečenim ili prstasto deljenim listovima. Cvetovi u vršnim štitovima hermafroditni, fertilni, u bočnim štitovima većinom muški. Čašica sa 5 zubaca. Krunični listići beli, žuti ili ružičasti, obrnuto jajasti, usečeni. Plod spljošten, okružen krilatim obodom. Plodići na leđnoj strani sa tankim rebrima. Brazde sa po 1 kanalom sa etraskim uljem, na ventarlnoj strani 2-4 kanala. Rod obuhvata oko 70 vrsta, rasprostranjenih na severnoj polulopti. U Srbiji raste 5 vrsta.

### ***Heracleum sphondylium* L. - mečja šapa**

Dvogodišnja do višegodišnja biljka jakog, neprijatnog mirisa (**Slika 1.1.10**). Rizom debeo, vretenast, razgranat, spolja žućkast, unutra bele boje, u proleće se u njemu nalazi žućkasti sok. Stabljika uspravna, visine 30-150 cm, šuplja, rebrasta, razgranata, obrasla oštrim dlakama. Listovi po obliku različiti: nedeljeni ili samo deljeni, ili prizemni celi, a na stabljici perasto deljeni sa 3-5 nesimetričnih režnjeva po obodu grubo nazubjenih, sa kratko šiljastim zupcima. Liske maljavu rapave, ponekad gole ili po nervima trepljasto dlakave. Donji listovi često vrlo veliki, do 60 cm, na drškama, gornji sedeći sa proširenim rukavcem. Štitovi najčešće veliki, oko 20 cm u prečniku, gotovo ravni, sa 10-30 u donjem delu maljavu dlakavih zrakova različite dužine. Štitići sa većim brojem cvetova. Involukruma nema ili je od 1-6 kratkih listića. Involucelum iz većeg broja lancetastih ili linearnih, gusto dlakavih listića. Čašica sa kratkim i širokim zupcima. Krunični listići beli ili zelenkasti, zeleno žuti ili žućkasti, ružičasti, crvenkasti ili plavičasti, obrnuto srcasto zaokruženog oblika. Plodnik maljav. Plod eliptičnog, šire ili uže obrnuto jajastog oblika ili skoro okrugao, dužine oko 6-10 mm, sa običnim krilima širine do 1 mm. Rebra na dorzalnoj starni končasta. Žigovi dužine do 4 mm, skoro uspravni (Nikolić, 1973). Cveta leti. Svojestvenog je mirisa i gorkog ukusa (Tucakov, 1986).



**Slika 1.1.10. *Heracleum sphondylium* L.**

**Stanište:** U ravnicama pored puteva, na livadama, šikarama, u gustim vlažnim šumama, po obodima šuma, penje se preko granice šume, na stenovitim obroncima. Zabeležena je u zajednicama: *Querceto-Carpinetum serbicum*, *Junipereto-Salicetum silesiaca*, *Fagetum montanum serbicum*, *Abieto-Fagetum serbicum calcicolum* i dr. (Nikolić, 1973).

**Opšte rasprostranjenje:** Gotovo cela Evropa, zapadna i severna Azija, zapadni deo severne Afrike – Evroazijski florni elemenat (Nikolić, 1973).

**Upotreba:** Koristi se koren i nadzemni deo biljke. Komponente koje sadrže su etarsko ulje, glutamin, arginin, galaktan, araban, holin, sterole, kumarinske heterozide i dr. Upotrebljava se u narodnoj medicini, za jačanje apetita, protiv proliva i katara creva (Tucakov, 1986).

## **Rod *Tordylium* L.**

Jednogodišnje ili dvogodišnje biljke. Cvetovi hermafroditni i muški. Čašica sa 5 zubaca. Involukrum i involucelum iz većeg broja listića. Plod spljošteno elipsoidnog ili spljošteno loptastog oblika, okružen širokim, debelim obodom. Rebra končasta. Brazde sa po 1-3 kanala sa etarskim uljem, na ventralnoj strani 2-10 ili više kanala. Rod obuhvata oko 16 vrsta rasprostranjenih uglavnom u Sredozemlju. U Srbiji raste samo 1 vrsta.

### ***Tordylium maximum* L. (*Heracleum tordylium* Spreng.) – vrtovilje**

Jednogodišnja ili dvogodišnja biljka sa vretenastim korenom. Stabljika uspravna, visine 30-120 cm, izbrazdana, razgranata, pokrivena položenim dlakama. Listovi perasto deljeni, sa 3-4 para režnjeva; prizemni na dugačkim drškama, maljavim, ostali na kraćim drškama ili ponekad sedeći, sa kratkim čekinjasto maljavim rukavcem, režnjevi jajasto ili eliptično-lancetasti, sedeći, prema osnovi suženi, po obodu testerasto nazubljeni, sa šiljatim zupcima, čekinjasto dlakavi; vršni režnjevi veći, ponekad trodelni. Štitovi na dugačkim drškama, srednje veličine, sa 9-15 zrakova različite dužine. Involukrum i involucelum iz većeg broja lancetastih ili linearnih, čekinjasto dlakavih listića. Cvetovi hermafroditni i muški, na obodu štita zigomorfni. Zraci na čašici lancetasti, čekinjasto dlakavi. Krunični listići beli. Plod zaobljeno elipsoidnog oblika, dužine 5-7 mm, okružen zadebljalim obodom često širine oko 1 mm, obrastao položenim čekinjastim dlakama. Brazde sa pojedinačnim kanalima sa etarskim uljem, na ventralnoj strani po 2-4 kanala (**Slika 1.1.11**).

**Stanište:** Na sunčanim peskovitim i stenovitim terenima, šikarama, neobrađenim površinama, poljima, utrinama, pored puteva, u vinogradima.

**Opšte rasprostranjenje:** Srednja i južna Evropa, jugozapadna Azija.- Mediteranski (srednjoevropski) florni elemenat.

**Rasprostranjenje u SR Srbiji:** Rasprostranjena (Nikolić, 1973).

**Upotreba:** Za sada nije zabeležena upotrebna vrednost.



**Slika 1.1.11. *Tordylium maximum* L.**

### **Rod *Cachrys* L.**

Listovi 3-4 puta perasto deljeni sa končastim isečcima. Čašični zupci slabo приметni. Krunični listići jajasti, celi, sa savijenim vrhom. Plod krupan, obao, bočno spljošten, sa naduvenom oplodnicom. Plodići sa 5 spojenih, slabo приметnih rebara. Kanali sa etarskim uljem mnogobrojni. Cvetovi žuti. Rod obuhvata 22 vrste rasprostranjene u južnim delovima Evrope i Azije. U Srbiji raste par vrsta (Nikolić, 1973).

### ***Cachrys cristata* DC. (*Hippomarathrum cristatum* (DC.) Boiss.) - krestasti kahris**

Višegodišnja biljka, sa glatkim i uspravnim stablom (Slika 1.1.12). Grane naspramne ili pršljenaste. Listovi 2 do 4 puta perasto deljeni, jajasti; režnjevi veličine 15x1 mm, tvrdolisni, uski, razgranati. Brakteje i brakteole kratke, linearne. Plod 7-10 mm, gotovo krilat, sa brazdama (Tutin, 1968). Ova vrsta je opisana u Crvenoj knjizi flore Srbije kao kritično ugroženi takson (Randjelović i Randjelović, 1999).



**Opšte rasprostranjenje:** Južna Italija, južni deo Balkanskog poluostrva, Egejski region (Tutin, 1968).



**Slika 1.1.12.** *Cachrys cristata* DC.

**Upotreba:** U Turskoj se koristi kao začin u prehrambenoj industriji i tradicionalno za pravljenje tzv. Tarhana supe (Özek i sar., 2007).

### **Rod *Opopanax* Koch**

Listovi perasto deljeni, sa zvezdastim dlakama na naličju, celi ili retko duboko usečeni. Čašični listići odsutni. Krunični listići žuti, jajasto-izduženi, uvijeni. Plod objajastog do loptastog oblika, snažno dorzalno spljošten. Lateralne brazde spojene i formiraju okvir oko ploda pre njegovog pucanja; dorzalne brazde male, uzane; poseduje od 2-3 kanala etarskog ulja.

#### ***Opopanax hispidus* (Friv.) Griseb.**

Robusna biljka sa snažnim, čvrstim stablom, visine do 300 cm (**Slika 1.1.13**). Režnjevi obično 2-4 cm, jajasto-lancetasti, dlakavi. Plod veličine 7-9 mm, široko eliptični; brazde široke, tanke.



**Slika 1.1.13. *Opopanax hispidus* (Friv.) Griseb.**

**Opšte rasprostranjenje:** Južni deo Balkanskog poluostrva i Egejski region; južna Italija i Sicilija (Tutin, 1968).

**Upotreba:** U Turskoj se sveže stablo koristi za lečenje steriliteta (Özgen i sar., 2012).



## **1.2. Etarska ulja**

### **1.2.1. Opšte karakteristike etarskih ulja**

Etarska ulja predstavljaju specifične, najčešće tečne produkte biljnog tkiva. To su više ili manje složene smeše različitih mono-, seskviterpena i fenilpropanskih jedinjenja (Kovačević, 2004). Biljke u kojima su glavni sastojci isparljivi, mirisni proizvodi-etarska ulja, nazivaju se aromatične biljke. Aromatične biljke su dosta rasprostranjene u prirodi. Veliki broj takvih biljaka se i gaji radi proizvodnje sirovina (aromatične droge), začina i etarskih ulja. Etarska ulja se iz aromatičnih biljaka dobijaju na razne načine. Najviše se primenjuje destilacija pomoću vodene pare. Ovaj način se koristi i za industrijsko dobijanje etarskih ulja. Količina etarskih ulja u aromatičnim biljkama, odnosno drogama varira u širokim granicama od oko 0.05% do nekih 20%. Etarska ulja su bistre, aromatične, lako pokretljive, isparljive, bezbojne ili žućkaste tečnosti. Hlađenjem neka etarska ulja očvrstnu ili se iz njih izlučuju čvrsti sastojci (stearopteni ili kamfori). Etarska ulja se praktično ne rastvaraju u vodi. Međutim, lako se rastvaraju u etanolu, masnim uljima i mnogim organskim rastvaračima (etar, hloroform...). Dužim stajanjem se često usmole, zgusnu, potamne i reaguju kiselo. Imaju svojstven miris, dok je većina etarskih ulja ljutog ili aromatičnog ukusa.

Aromatične biljke i etarska ulja se upotrebljavaju pre svega u hemijsko-farmaceutskoj industriji i apotekama za izradu raznih lekovitih preparata, zatim u proizvodnji kozmetičkih i parfimerijskih proizvoda, u prehrambenoj industriji kao začina, u industriji bezalkoholnih i alkoholnih napitaka, poslastica i sličnih proizvoda, u duvanskoj industriji itd. (Sarić i sar., 1989).

#### **1.2.1.1. Priroda i rasprostranjenost etarskih ulja**

Etarska ulja su zastupljena u celom biljnom carstvu, međutim posebno su zastupljena u biljkama iz izvesnih familija: Pinaceae, Zingiberaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Myrtaceae. Sadrže ih gotovo svi biljni organi, naročito cvetonosni, ali ih nalazimo i u korenju i rizomima, kori, drvetu,

plodovima, semenju. Treba istaći da je za jednu istu vrstu sastav etraskih ulja varijabilan za različite organe, što zavisi od uslova sredine. U toplom klimatu, sadržaj etarskog ulja je veći. Zato se često kaže da su etarska ulja proizvodi heliosinteze. S druge strane, postoje stvarno "hemijske rase" kod mnogih aromatičnih biljaka (Gorunović i Lukić, 2001).

### 1.2.1.2. Lokalizacija etarskih ulja

U pogledu lokalizacije, etarska ulja mogu da se nalaze u nediferenciranim ćelijama ili mnogo većim od ostalih ćelija tkiva (idioblastima) (Lauraceae, Zingiberaceae). Najčešće su ona lokalizovana u sekretornim organima: *žlezde* koje se javljaju kod biljaka iz familije Lamiaceae i Asteraceae, gde se etarsko ulje nagomilava ispod kutikule; *sekretorni šizogeni kanali* (Myrtaceae), nastaju ponovljenom deobom jedne ćelije i razmicanjem ćelija i *sekretorni kanali* (Apiaceae), čiji proizvodi lučenja daju isto tako smole (Gorunović i Lukić, 2001). Etarsko ulje se sintetiše u sekretornim ćelijama epitelijuma i izlučuje u posebne intercelularne prostore (lumen ili lakuna). Lumen kanala i šupljina može se formirati na tri načina:

- šizogeno, razdvajanjem ćelijskih zidova susednih ćelija, proces sekrecije je merokrin;
- lizogeno, autolitičkim kidanjem nekih ćelija, proces sekrecije je holokrin;
- šizo-lizogeno, kombinovanjem prethodna dva procesa (Metcalf i Chalk, 1989; Jančić i sar., 1995).

Šizogeni sekretorni kanali štitonoša (Apiaceae) nalaze se u plodovima i svim vegetativnim organima. U plodovima su oni na poprečnom preseku izrazito eliptični sa zadebljalim ćelijskim zidovima epitelijuma i označavaju se kao *vittae* (Pagni, 1985; Pagni i sar., 1989; Corsi i Pagni, 1991; Jančić i sar., 1995). Broj i položaj *vittae* na poprečnom preseku merikarpa značajni su taksonomski karakteri (Corsi i Pagni, 1991; Jančić i sar., 1995). Prema pojedinim autorima, sadržaj sekretornih kanala kod štitonoša nije sa sigurnošću utvrđen (Esau, 1977; Jančić i sar., 1995). Drugi autori smatraju da se pored kumarina, kao glavnog produkta sekrecije nekih štitonoša, sintetišu i manje količine etarskog ulja (Stjepanović i sar., 1973; Pavlović i sar., 1989; Jančić i sar., 1995). Veća količina etarskog ulja se može naći u samom korenu štitonoša. Postoje

podaci koji ukazuju na to da se sastav etarskog ulja menja u trenutku kada dolazi do debljanja stabla i nastanka sekundarnih kanala etarskih ulja. Promena je naročito uočljiva kod seskviterpenskih ugljovodonika (Stahl-Biskup i Wichtmann, 1991).

### **1.2.1.3. Fizička svojstva etarskih ulja**

Etarska ulja su na sobnoj temperaturi tečnosti, aromatičnog mirisa, retko obojena kad su sveža. Njihova gustina je mnogo češće ispod gustine vode. Među etarskim uljima ima i onih koja imaju veću gustinu od vode (cimetovo i dr.). Imaju povećan indeks refrakcije i veoma često su optički aktivna jedinjenja. Otuda se za oficinalna, pre svega, ali i za druga etarska ulja uvek traži određivanje specifične težine i parametri indeksa refrakcije i ugla skretanja. Ona se isparljiva sa vodenom parom jer podležu Daltonovom zakonu, po kome će smesa dve tečnosti koje se ne mešaju i ne reaguju hemijski međusobno, u ovom slučaju voda i etarsko ulje, proključati kad zbir parcijalnih pritisaka pare obe tečnosti bude jednak atmosferskom pritisku (760 mm Hg=101 325 Pa=101 325 kPa=1 013 mbar). Temperatura ključanje pojedinih komponenti etarskih ulja kreće se u granicama od 150-350°C (npr.  $\alpha$ -pinen ključa na 155-157°C,  $\beta$ -pinen na 163-166°C, limonen na 176-178°C, geraniol na 227-230°C, karvon na 230-231°C, karvakrol na 237-238°C, eugenol na 248-252°C itd.). Slabo se rastvaraju u vodi, odnosno rastvoreni su samo izvesni njihovi sastojci, koji daju miris aromatičnim vodama (*Aquae aromaticae*). Rastvorljiva su u etanolu, etru, većini organskih rastvarača i u masnim uljima (Gorunović i Lukić, 2001).

### **1.2.1.4. Hemijski sastav etarskih ulja**

Etarska ulja su smeše sastojaka kod kojih su glavni terpeniski ugljovodonici (alifatični, mono- i biciklični, ponekad seskviterpenski) i njihovi oksidovani proizvodi (alkoholi, aldehidi, ketoni). Pored ovih komponenti u sastav etarskog ulja ulaze i aciklična jedinjenja: niže monokarbonske organske kiseline (mravlja, sirćetna, valerijanska), alkoholi, aldehidi, ketoni, metilmonilketon i naročito aromatični derivati: aldehidi (anizaldehid, cimetni aldehid), fenoli i njihovi etri (timol, eugenol, anetol); na kraju nalaze se i kumarini (bergapten i umbeliferon).

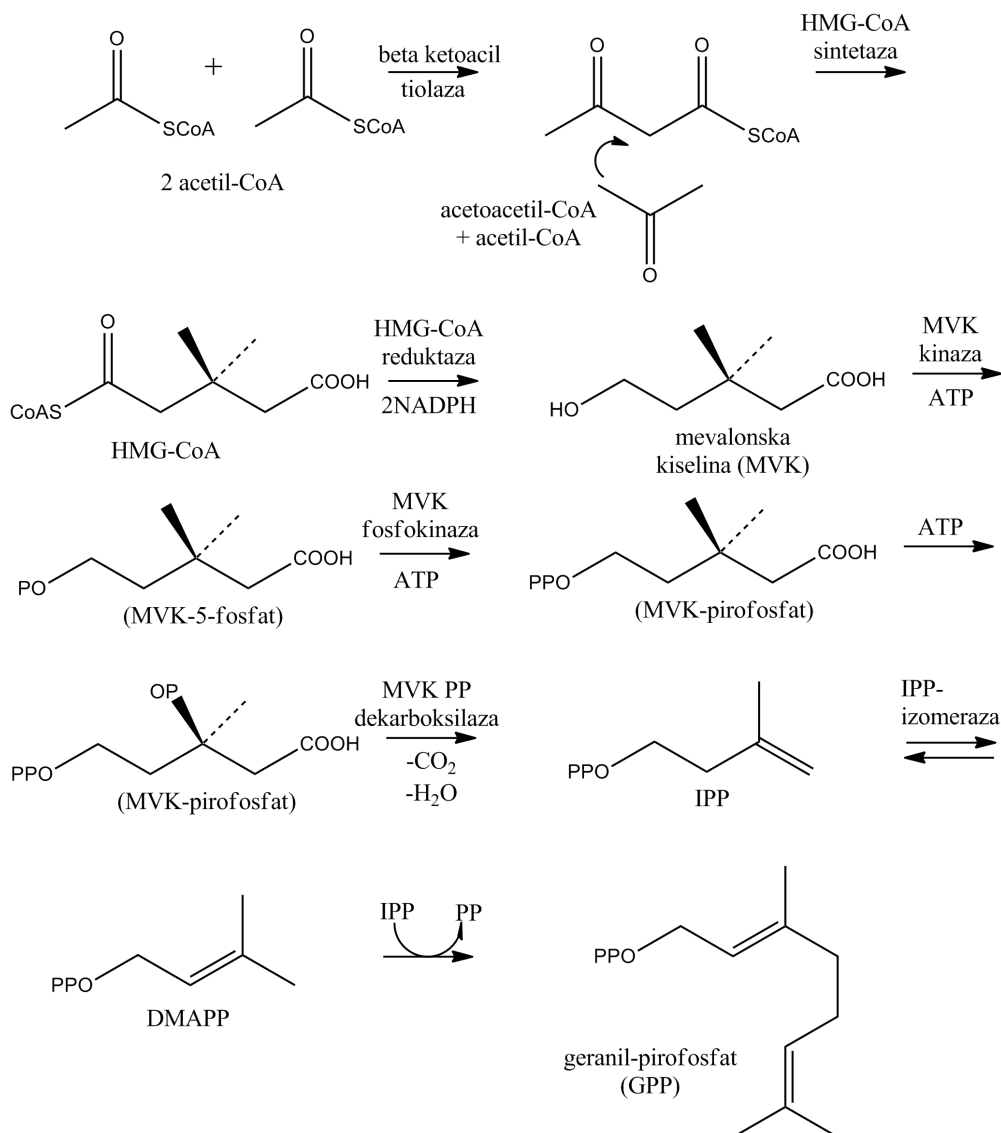
Etarska ulja se klasifikuju prema njihovim glavnim sastojcima. Mogu biti **ugljovodonici**: pineni (*Aeth. Terebinthinae*), limonen (*Aeth. Citri*), **alkoholi**: geraniol i citronelol (*Aeth. Rosae, Aeth. Geranii*), linalol (*Aeth. Aurantii Floris ili Aeth. Neroli, Aeth. Bergamottae, Lavandulae, Coriandri*); mentol (*Aeth. Menthae*), **aldehidi**: citral (*Aeth. Citri, Aeth. Melissae*); **ketoni**: tujon (*Aeth. Absinthii, Salviae, Thuyae*); cineol (*Aeth. Eucalypti, Niaouli*); anetol (*Aeth. Anisi, Anisi Stellati*); timol (*Aeth. Thymi*) itd (Gorunović i Lukić, 2001).

Terpeni su derivati izoprena (2-metil-1,3-butadiena). Strukture svih izoprenoida od monomera (hemiterpena) do najviših polimera, kaučuka, mogu se izvesti primenom tzv. "izoprenskog pravila" koje je postavio Wallach, još početkom ovog veka i po kojem se strukture svih terpenoida mogu izvesti "glava-rep" vezivanjem izoprenskih, C<sub>5</sub>-jedinica (Wallach, 1914; Jančić i sar., 1995). Najznačajnije otkriće u rasvetljavanju puteva biosinteze terpena poznato je kao "Biogenetsko izoprensko pravilo", koje je postavio Ružika, 1953 godine i po kojem svi terpeni koji postoje u prirodi nastaju iz nekoliko prostih acikličnih supstanci (Jančić i sar., 1995). U zavisnosti od broja izoprenskih jedinica, dele se na hemiterpene (C<sub>5</sub>), monoterpene (C<sub>10</sub>), seskviterpene (C<sub>15</sub>), diterpene (C<sub>20</sub>), triterpene (C<sub>30</sub>), tetraterpene (C<sub>40</sub>) i politerpene:

- 1) C<sub>5</sub> - *Hemiterpene*
- 2) C<sub>10</sub> - *Monoterpene* (regularne i iregularne) i njihove derivate:
  - regularne
    - a) alifatične (mircen, ocimen, citronelal, citronelol, geraniol, nerol, linalol, citral i dr.)
    - b) monociklične (limonen, terpinolen, α-terinolen, γ-terpinen, α- i β-felandren i dr.
    - c) biciklične (α-tujen, sabinen, δ-3-karen, α-pinen, kamfor, β-pinen, borneol i dr.)
  - iregularne (piretrini, cinerini, jasmolini i dr.).
- 3) C<sub>15</sub> - *Seskviterpene* (isparljive i neisparljive) i njihove derivate:
  - isparljive
    - a) alifatične (farnezol, nerolidol i dr.)
    - b) monociklične (bisabolen, zingiberen i dr.)

- c) makrociklične (humulen, germakren i dr.)
  - d) biciklične (kariofilen, azulen, gvajol,  $\beta$ -selinen, kadalen, kadinen i dr.)
  - e) triciklične (kedren, kedrol i dr.)
  - neisparljive (seskviterpenske laktone: artemizin, santonin, partenolid, alantolaktonin, helanalin i dr.).
- 4)  $C_{20}$  - *Diterpene* i njihove derivate:
- a) alifatične (geranilgeraniol, geranillinalol, fitol i dr.)
  - b) biciklične (manool, marubin i dr.)
  - c) triciklične (abietinska kiselina, podokarpna kiselina i dr.)
  - d) tetraciklične (filokladen, kauren, steviol, kafestol i dr.)
  - e) diterpene mikrobiološkog porekla (giberelini)
- 5)  $C_{25}$  – *Sesterterpene*:
- a) alifatične (geranilfarnezol, geranilnerolidol i dr.)
  - b) ciklične (opiobolin, gaskardinska kiselina i dr.)
- 6)  $C_{30}$  - *Triterpene i steroide* i njihove derivate:
- triterpene:
    - a) alifatične (skvalen i dr.)
    - b) triciklične (ambrein i dr.)
    - c) tetraciklične (onocerin, lanosterol i dr.)
    - d) pentaciklične (oleanolna kiselina,  $\beta$ -amirin,  $\alpha$ -amirin, fridelin, cerin i dr.)
    - e) norterpene (fusidinska kiselina i dr.)
  - steroide (fitosteroli, sapogenini, steroidni alkaloidi, aglikoni kardiotoničnih heterozida i dr.)
- 7)  $C_{40}$  - *Tetraterpene* i njihove derivate (karotenoidi, biksin, kapsantin, kapsorubin, krocetin, krocin, fukoksantin i dr.)
- 8)  $C_n$  - *Politerpene* i njihove derivate (gutaperka, kaučuk i dr.)

Biosinteza mono-, seskvi- i diterpena odvija se uz (1→4) vezivanje izoprenskih jedinica (asimetrično vezivanje, "glava-rep"). Biosinteza tri- i tetraterpena obuhvata i dimerizaciju tipa (4→4), "rep-rep" vezivanje (simetrično) (**Slika 1.2.1.4**).

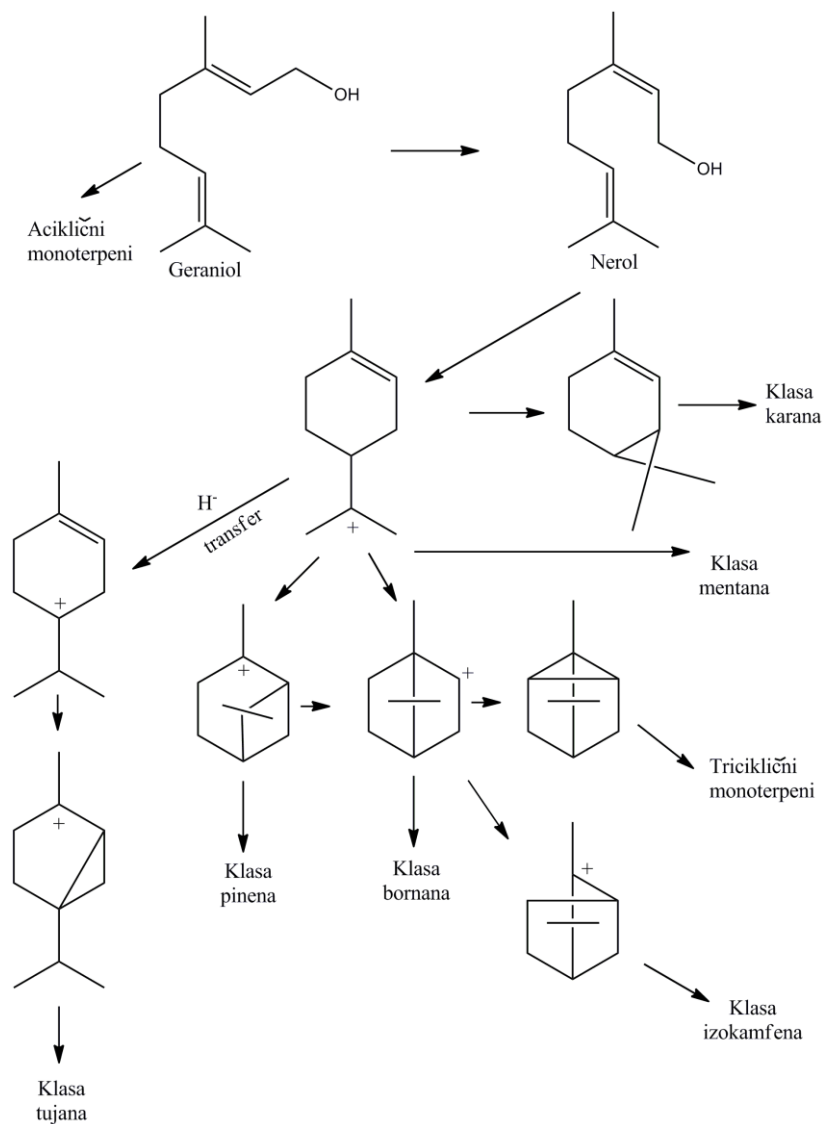


**Slika 1.2.1.4. Biosinteza terpena**

Biosinteza terpena započinje iz dva molekula acetil-CoA, koji u prisustvu ketoaciltiolaze daju acetoacetyl-CoA. U prisustvu još jednog molekula acetil-CoA, pod uticajem HMG-CoA-sintetaze (hidroksi-metil-glutaril-CoA-sintetaza), nastaje (3S)-3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), koji odvajanjem CoA-ostatka i redukcijom pomoću NADPH (dva molekula nikotin amid adenindinukleotid fosfat-koenzim, enzima reduktaze) u prisustvu HMG-CoA reduktaze daje mevalonsku kiselinu (MVK). Mevalonska kiselina se pomoću ATP (adenozintrifosfat) u prisustvu MVK kinaze prevodi u monofosfat, a pomoću još jednog molekula ATP i MVK-fosfokinaze u pirofosfat. Tercijarna OH-grupa se zatim fosforiliše u prisustvu još jednog molekula

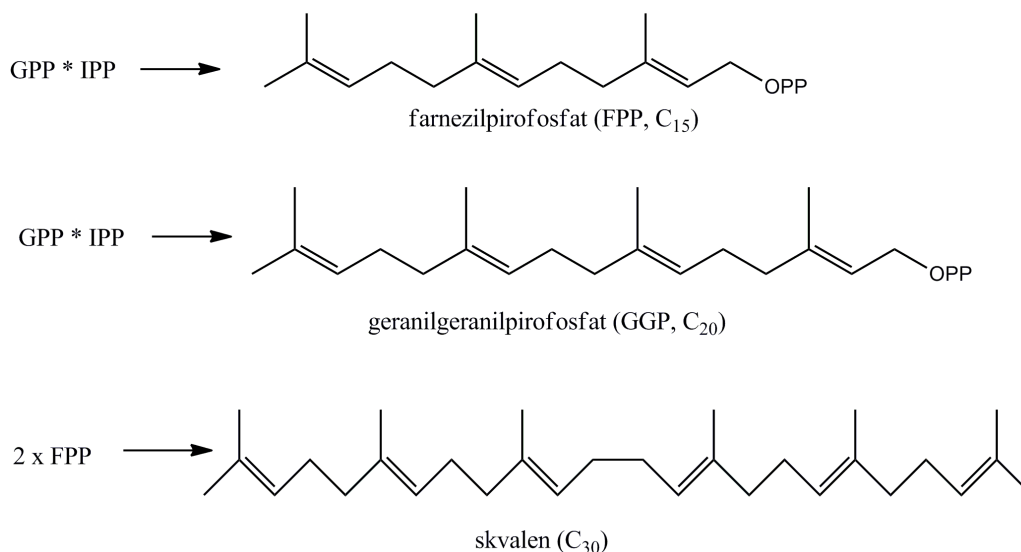
ATP-a. Eliminacijom fosforne kiseline i ugljen dioksida pod uticajem MVKPP-dekarboksilaze nastaje izopentenil-pirofosfat (IPP), koji je u prisustvu IPP-izomeraze u ravnoteži sa 3-dimetilalil-pirofosfatom (DMAPP). Izopentenil pirofosfat i 3,3-dimetilalil-pirofosfat predstavljaju biogenetske izoprenske jedinice svih terpena. Kondenzacijom IPP i DMAPP nastaje geranil-pirofosfat (GPP) sa 10 C-atoma, koji je direktni prekursor svih monoterpena i igra ključnu ulogu u biosintezi svih viših terpena.

Biosinteza monoterpena započinje tako što se geranilpirofosfat (GPP) u toku biosinteze najpre prevodi u *cis*-izomer nerol, koji lako podleže ciklizaciji uz formiranje karbokatjona. Reakcijama preuređenja i oksidacije iz njega nastaje niz drugih monoterpena (Slika 1.2.1.5).



Slika 1.2.1.5. Biosinteza monoterpena

Kondenzacijom geranilpirofosfata (GPP) sa još jednim molekulom izopentenil-pirofosfata (IPP) u prisustvu enzima preniltransferaze nastaje farnezil-pirofosfat (FPP, C<sub>15</sub>), prekursor svih seskviterpena. Diterpeni su derivati geranil-geranil-pirofosfata (C<sub>20</sub>), koji nastaje adicijom IPP na farnezil-pirofosfat (FPP) ili kondenzacijom dva molekula geranil-pirofosfata. Dimerizacijom farnezil-pirofosfata (FPP) nastaje skvalen (C<sub>20</sub>), neposredni prekursor za biosintezu svih terpena (**Slika 1.2.1.6**) (Gorunović i Lukić, 2001).



**Slika 1.2.1.6. Biosinteza prekursora viših triterpena**

Mnoge studije pokazuju da je hemijski sastav etarskih ulja različitih vrsta familije Apiaceae dosta raznovrstan. U najvećoj meri ima monoterpena, zatim seskviterpena, diterpena ima jako malo, fenilpropanoide, ftalida, oktanol i oktil estra, trimetilbenzaldehida i alifatičnih aldehida. Treba imati na umu da je hemijski sastav etarskih ulja jako varijabilan i da zavisi od mnogih faktora, pre svega od geografskog, genetičkog, fiziološkog i ontogenetskog. Kod pojedinih vrsta moguće je utvrditi hemotipove na osnovu sastava etarskog ulja, ali u većini slučajeva nema dovoljno podataka za formiranje infraspecijskih kategorija (Chizzola, 2010).



### **1.2.2. Biološka funkcija etarskih ulja**

Biološka uloga etarskih ulja je povezana sa atraktantnim delovanjem na insekte, čime je obezbeđeno prenošenje polena i oprašivanje biljaka. Interesantni su i podaci o specifičnim efektima ulja jedne biljke, koje prelazi u podlogu i inhibira klijanje semena drugih biljaka (autopatija). Neka etarska ulja sprečavaju klijanje sopstvenih semena i obezbeđuju životni prostor svake individue. Značajna je i uloga etarskih ulja u zaštiti biljaka od napada insekata i životinja, herbivora (Kovačević, 2004). Pokazano je da etarska ulja izolovana iz pojedinih vrsta familije Apiaceae, poseduju insekticidnu aktivnost, upravo zbog prisustva glavnih komponenti koje se nalaze u tim uljima kao što su  $\alpha$ -,  $\beta$ -pinen. Mnogi ekstrakti, kao što su vodeni i metanolni, dobijeni iz biljnog materijala pojedinih vrsta familije Apiaceae, zabeleženo je da mogu imati repelentno dejstvo zahvaljujući prisustvu furanokumarina (Evergetis i sar., 2012). Postoji teorija koja je delimično prihvaćena da biljke pomoću svojih isparljivih produkata stvaraju specifičnu mikroklimu, koja ih štiti od prekomerne transpiracije u različitim nepovoljnim uslovima. Gotovo sva ulja više ili manje intenzivno sprečavaju razvoj mikroorganizama i tako suzbijaju širenje infekcija na biljkama u kojima nastaju (Kovačević, 2004).

Biološka aktivnost etarskih ulja može se povezati i sa njihovim delovanjem na zdravlje i druge potrebe čoveka. Neke od tih aktivnosti su: antibakterijska, antifungalna, sedativna, hipoglikemijska, spazmolitička, diuretična, antivirusna i antifungalna. Pored navedenih aktivnosti, monoterpeni, kao lako isparljiva jedinjenja, koriste se i u aromaterapiji kao sredstva koja potpomažu relaksaciju prilikom nervne napetosti. Mnoge biljke su od davnina korišćene u obliku čajeva i drugih preparata, zbog blagotvornog delovanja njihovih isparljivih komponenti (Marin, 2003).

### **1.2.3. Varijabilnost sadržaja i sastava etarskih ulja i njihov taksonomski značaj**

Kao što je slučaj i sa drugim sekundarnim metabolitima biljaka i produkcija etarskih ulja je genetski definisana (Kovačević, 2004). Biosinteza terpena odvija se u sekvencama i svaka pojedinačna transformacija je kontrolisana posebnim genom

odgovornim za biosintezu enzima koji datu transformaciju katalizuje. Ukoliko iz genetskih razloga enzim nije aktivan biogeneza će se zaustaviti u određenoj tački, što će rezultirati u akumulaciji poslednje sintetizovane komponente (Jančić i sar., 1995). Samo do nekih granica, genetska kontrola je podložna uticajima endogenih i egzogenih faktora. Ne postoje opšta pravila, tako da neke biljne vrste u različitim klimatskim uslovima i različitim delovima sveta proizvode približne količine etarskog ulja, gotovo identičnog sastava. S druge strane, pojedinačne jedinice u okviru iste populacije biljaka mogu sintetisati međusobno različita etarska ulja. Ovakva varijabilnost biljnog genoma, omogućava pojavu različitih hemijskih rasa (hemotipova biljaka), kao i mogućnost izdvajanja visokoproduktivnih linija, i njihovo vegetativno kloniranje.

Najvažniji faktori koji mogu uticati na sastav etarskog ulja neke vrste (jedinke) su:

- genotip,
- fenofaza ontogenetskog razvoja, što je veoma značajno za definisanje optimalnog vremena prikupljanja biljnog materijala,
- ekološki faktori (faktori sredine),
- način obrade biljne sirovine,
- način izolacije etarskog ulja.

Količina i sastav etarskog ulja može da zavisi i od faze ontogenetskog razvoja biljke. Proučavanjem ovakvih uticaja određuje se optimalno vreme prikupljanja biljnog materijala. Temperatura, vlažnost i aeracija zemljišta, mineralne soli u podlozi, nadmorska visina, dužina izloženosti svetlu i kvalitet svetlosti, vlažnost vazduha i vazдушna strujanja, mogu da utiču na promenljivost količine etarskog ulja u biljnom materijalu. Ispitivanja uticaja ovih faktora na aromatične sirovine, interesantan je s dva aspekta. Kod samoniklih biljaka mogu biti definisana geografska područja i regioni s kojih se može dobiti najkvalitetnija droga (droga definisanog geografskog porekla). U odnosu na gajene vrste, proučavanjem ovih faktora uticaja, mogu biti definisani optimalni uslovi gajenja, koji obezbeđuju količinu i kvalitet biljne mase. Svaka obrada aromatične sirovine (sušenje, usitnjavanje, ekstrakcija) uslovljava delimičan gubitak etarskog ulja i promene njegovog sastava (Kovačević, 2004). Jedna od značajnih karakteristika terpena je da se njihova distribucija i sastav mogu uspešno koristiti u sistematici biljaka. Kao što je već poznato kod terpena je prisutna varijabilnost koja nastaje kao posledica ekoloških i genetičkih faktora. Iz tih razloga za analizu etarskih

ulja neophodno je istražiti varijabilnost unutar i između populacija određenog taksona, pre nego što se vrše hemotaksonomska istraživanja (Marin, 2003).

### 1.3. Ekstrakti

Ekstrakti su koncentrovani pripravci dobijeni iz biljnih ili animalnih droga. Mogu biti u tečnom, polutečnom i čvrstom stanju (*extractum fluidum, extractum spissum, extractum siccum*) (Kovačević, 2004). Sam termin ekstrakcija podrazumeva razdvajanje medicinski aktivnih delova biljaka od neaktivnih ili inertnih komponenti pomoću selektivnih rastvarača, prateći standardne procedure ekstrakcije. Kao takav, ekstrakt može biti iskorišćen kao sastavni deo tableta ili kapsula napravljenih od lekovitih biljnih komponenti (Handa i sar., 2008). Pre procesa ekstrakcije, droga mora biti pripremljena (usitnjena do konzistencije grubog praška). Priprema se obavlja različitim tehnikama: maceracijom, digestijom, perkolacijom, ekstrakcijom superkritičnim fluidima, ultrazvučnom ekstrakcijom (Kovačević, 2004). Kao sredstvo za ekstrakciju najčešće se koristi:

- alkohol različite koncentracije
- manje polarni rastvarači (aceton, heksan, etar...)
- polarniji rastvarači (propilen glikol, glicerol...)
- masna ili mineralna ulja.

Faktori koji utiču na proces ekstrakcije su: stepen usitnjenosti materijala, dužina trajanja procesa ekstrakcije, viskozitet sredine, temperatura, solvensi (voda, etanol, glicerol). U *acetonu* i *etru* najbolje se rastvaraju alkaloidi, lipidi, smole i voskovi, *hlороform* je odgovoran za alkaloidne i heterozidne, *metanol* i *etanol* su rastvarači sa najširokom primenom jer su odgovorni za rastvaranje velikog broja hemijskih jedinjenja kao što su: alkaloidi, polifenoli, heterozidi, tanini, etarska ulja, smole, šećeri, organske kiseline i karotenoidi, u *vodi* se mogu rastvarati alkaloidi, polifenoli, heterozidi, tanini, proteini, šećeri, gume, organske kiseline, enzimi i karotenoidi, *glicerol* se koristi za rastvaranje tanina, guma, smola i skroba, dok se *propilenglikol* upotrebljava za pravljenje ekstrakata koji sadrže alkaloidne, etarska ulja i biljne pigmente.

U okviru familije *Apiaceae*, vršena su mnoga ispitivanja kako hemijskog sastava, tako i same biološke aktivnosti različitih ekstrakata. Detektovano je da se u ekstraktima velikog broja vrsta roda *Eryngium* nalaze terpenoidi, triterpenoidni saponozidi, kumarini, poliacetileni i steroidi. Zahvaljujući bogatom hemijskom sastavu, ovi ekstrakti su pokazali citotoksičnu, antiinflamatornu, antibakterijsku, antifungalnu,

antimalarijsku, antioksidativnu i antihiperглиkemijsku aktivnost (Wang i sar., 2012). Pokazano je i da se u metanolnim ekstraktima tri ispitivana taksona *Seseli pallasii* Besser, *S. libanotis* (L.) Koch ssp. *libanotis* i *S. libanotis* (L.) Koch ssp. *intermedium* (Rupr.) P. W. Ball, nalaze polifenolna jedinjenja, koja su odgovorna za njihovu dobru antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost (Matejić i sar., 2012).

## 1.4. Polifenoli

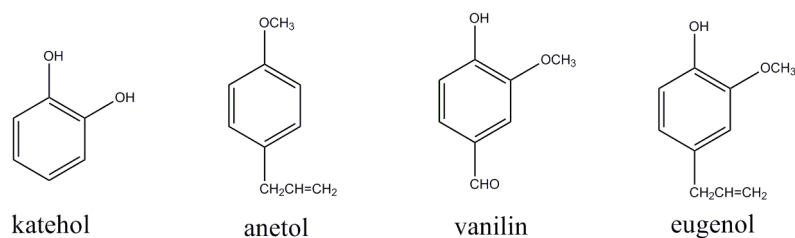
### 1.4.1. Opšte karakteristike polifenola

Polifenolna jedinjenja su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti u biljkama. Sreću se kako u podzemnim tako i u nadzemnim delovima biljaka. To su jedinjenja različitih strukturnih karakteristika koja u svojoj strukturi sadrže bar jedan aromatičan prsten sa fenolnim jezgrom kao osnovnim konstituentom. U ovu grupu spadaju različita jedinjenja fenolne strukture, koja su rasprostranjena u mikroorganizmima, biljkama, insektima, kičmenjacima i morskim organizmima.

Na osnovu hemijske strukture prirodna aromatična jedinjenja su razvrstana na:

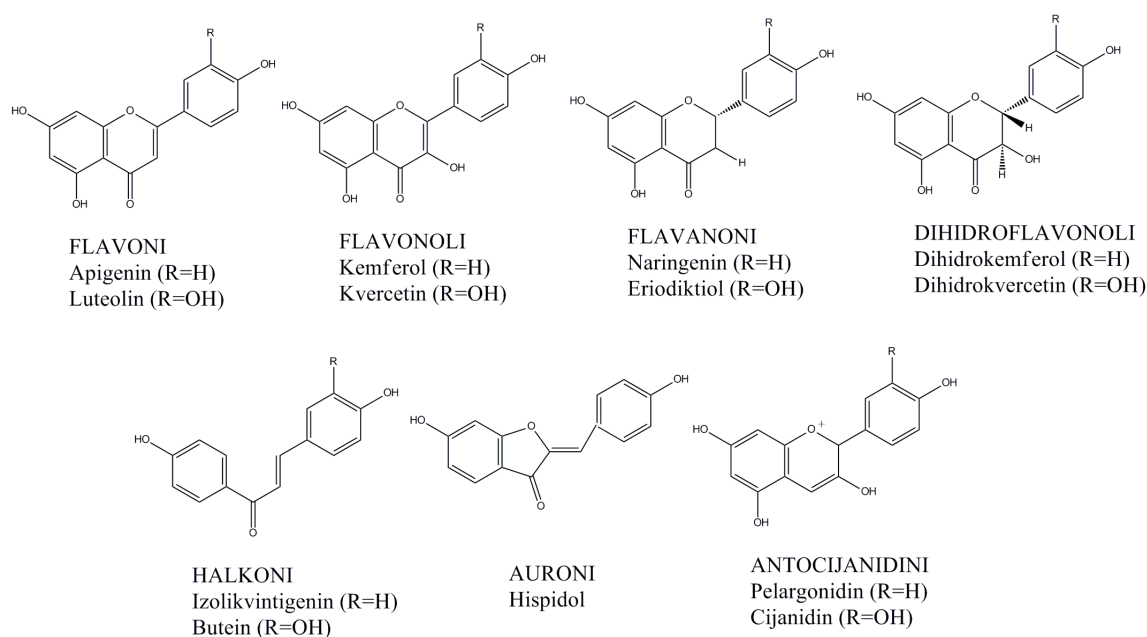
- 1) Prosta aromatična jedinjenja
  - Fenole, depside i tanine ( $C_6$  i  $C_6-C_1$  jedinjenja i njihove polimere)
  - Fenilpropane, lignane i lignine ( $C_6-C_1$  jedinjenja i njihove polimere)
- 2) Hinone, kumarine i njihove derivate
- 3) Hromosome i njihove derivate
- 4) Flavonoide ( $C_6-C_3-C_6$  jedinjenja) i jedinjenja slične strukture (Petrović, 2005).

Fenolne komponente su široko rasprostranjene u biljnom carstvu i karakterišu se hidroksilovanim benzenovim prstenom (**Slika 1.4.1**). Fenoli se najčešće javljaju kao polimerne kiseline ili glikozilirani estri i ispoljavaju različite funkcije, kao što je na primer, indukcija fenola odgovor na oštećenja i infekciju, odbijanje herbivora i sprečavanje širenja patogena.



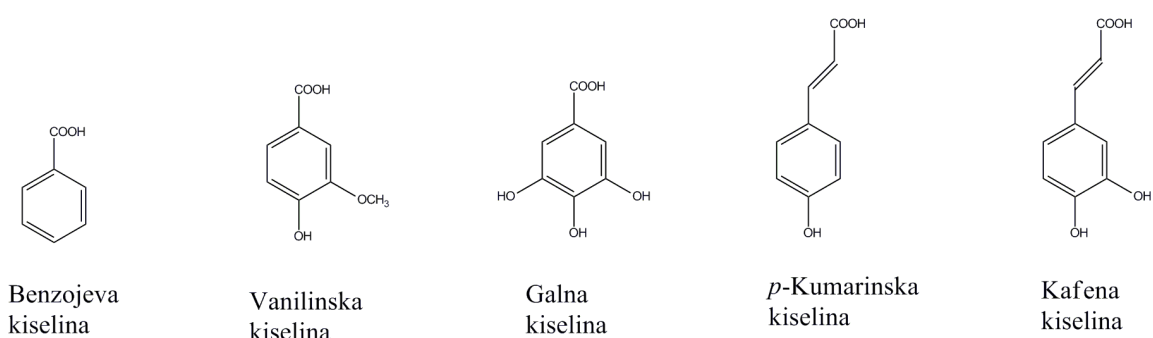
**Slika 1.4.1. Prirodni fenoli**

Termin „flavonoid“ predložili su Geisman i Hinseinner 1952. godine za determinaciju svih biljnih pigmenata, koji imaju C6-C3-C6 skelet, u kojima su dva benzenova prstena povezana preko C-3 jedinice (**Slika 1.4.2**) (Janićijević i sar., 2008). Iz biljaka je izolovano i proučeno preko 3000 flavonoida koji su, s obzirom na stepen oksidacije centralnog piranskog prstena, podeljeni u dvanaest klasa: *flavoni*, *izoflavoni*, *flavanoni*, *flavonoli*, *flavanoli*, *flavani*, *katehini*, *antocijanidini*, *leukoantocijanidin*, *halkoni*, *dihidrohalkoni* i *auroni*. Raznovrsnost i veliki broj struktura flavonoida rezultat su brojnih modifikacija njihovih osnovnih struktura kao što su: dodatne hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i najvažnije glikolizacija hidroksilnih grupa (nastajanje O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida). Razlikuju se od ostalih fenolnih jedinjenja u stepenu oksidacije njihovog centralnog piranskog prstena. Flavonoidi su čvrste supstance, bezbojne ili žute (lat. flavus=žut) izuzev antocijana koji menja boju od crvene do plave. Nesupstituisani flavon predstavlja bezbojnu supstancu, a uvođenje 1-OH grupe u položaju 3 (flavonol) dovodi do žutog obojenja. Veći broj OH-grupa čini ih manje toksičnim. U prirodi se obično nalaze u obliku glikozida ili estara sa taninskim kiselinama. Iz biljnog materijala se ekstrahuje vodom, a iz vodenog rastvora organskim rastvaračima (Harborne i Williams, 2000; Dashek, 2006).



**Slika 1.4.2. Osnovni tipovi flavonoida**

Fenolne kiseline se sastoje od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzojeve kiseline C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) ili tri (derivati cimetine kiseline C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) ugljenikova atoma (**Slika 1.4.3**). Fenolne kiseline obuhvataju hidroksi i druge funkcionalne derivate benzojeve i cimetine kiseline. Kao i većina prirodnih fenola, fenolne kiseline nastaju iz acetata, biosintetskim putem preko šikiminske kiseline. Fenolne kiseline i njihovi heterozidi su rastvoreni u polarnim rastvaračima i slabo baznim rastvorima. Derivati cimetine kiseline lako izomerizuju u vodenim rastvorima. U ekstraktima droga se mogu dokazati na osnovu bojenih reakcija fenolne grupe sa Fe<sup>+3</sup>, kao i na osnovu karakterističnog apsorpcionog spektra. Utvrđeno je da mnoge droge koje se tradicionalno koriste, sadrže upravo ova jedinjenja kao delotvorne sastojke. Možda je najznačajnije njihovo inhibitorno delovanje na enzim lipidnu peroksidazu i upravo se iz ovog razloga fenolne kiseline mogu koristiti kao konzervansi, antiinflamatorni agensi i kao antioksidansi (Kovačević, 2004).



**Slika 1.4.3. Osnovni tipovi fenolnih kiselina**

Kumarini su široko rasprostranjeni u biljnom svetu. Do sada je izolovano preko 1000 različitih struktura kumarina. Podela kumarina je izvršena na jednostavne kumarine i heterociklične kumarine. U okviru heterocikličnih, javljaju se furano- i piranokumarini. Jednostavni kumarini su najprisutniji u biljkama porodice Asteraceae i Fabaceae, dok se heterociklični kumarini javljaju u okviru porodica Rutaceae i Apiaceae. Slobodni ili u obliku heterozida, lokalizovani su u svim nadzemnim i podzemnim organima biljaka. Kumarini daju specifičan miris drogama koje ih sadrže (to je miris pokošenog sena) (Kovačević, 2004).



Sintetički antioksidansi koji se upotrebljavaju u prehrambenoj industriji su po strukturnim karakteristikama takođe fenolna jedinjenja: BHA – butilovani hidroksianizol, BHT – butilovani hidroksitoluen, TBHQ – 2-*terc*-butilhidroksihinon i PG – propilgalat. Njihova antioksidativna aktivnost je u tesnoj vezi sa strukturom, naročito sa njihovom sposobnošću otpuštanja vodonikovog atoma i stabilizacije proizvoda delokalizacijom elektrona u aromatičnom jezgru.

Familija Apiaceae se odlikuje prisustvom furanokumarina, flavona i flavonola. Flavoni i flavonoli nastaju kao aglikoni posle kiselinske hidrolize u svežim biljkama. U listovima ovih biljaka se može naći apigenin. Od flavonola najzastupljeniji su kvercetin i kemferol (Miean i Mohamed, 2001).

#### **1.4.1.1. Rasprostranjenost u prirodi i lokalizacija polifenola**

Polifenoli su široko rasprostranjeni u biljnom svetu. Naročito je interesantno da jedna ista biljna vrsta, sadrži i po nekoliko različitih polifenolnih jedinjenja. Flavonoidi su najčešće obojeni i iz tog razloga se već golim okom može utvrditi njihova lokalizacija u tkivu i ćeliji. Nije retka pojava da se u različitim biljnim organima akumuliraju različite grupe polifenolnih jedinjenja (Kovačević, 2004). Polifenolna jedinjenja se akumuliraju uglavnom u ćelijskim zidovima (Guern i sar., 1987; Monties, 1989) i to najvećim delom na površini ploda (epidermalni i subepidermalni slojevi), jer biosinteza ovih jedinjenja zavisi od svetlosti (Wollenweber, 1994; Macheix i sar., 1990).

#### **1.4.2. Biološka funkcija polifenola**

Polifenolna jedinjenja su od velike važnosti za biljke, jer grade integralni deo strukture ćelijskog zida, uglavnom kao polimeri (lignini). Ove strukture služe kao mehanička barijera u odbrani od mikroorganizama. Lignini su, posle celuloze, najzastupljenije organske strukture na zemlji (Wallace i Fry, 1994; Strack, 1997).

Najvažnija uloga flavonoida, naročito antocijana u kombinaciji sa flavonima i flavonolima kao kopigmentima, je u formiranju boje voća i cveća (Harborne, 1994; Strack, 1997). Boja cvetova i plodova je veoma bitna za privlačenje insekata i ptica u

cilju oprašivanja i raznošenja semena. Pored dobro poznatih isparljivih terpena, polifenolna jedinjenja rastvorna u vodi, kao što su derivati benzoeve i cimetine kiseline, mogu poslužiti kao alelopatske supstance. Polifenolna jedinjenja mogu biti i signalni molekuli u interakcijama biljke i bakterija koje fiksiraju azot kod mahunarki (Strack, 1997). Značajna uloga flavonoida i fenolnih kiselina je njihovo učešće u odbrambenom mehanizmu biljke. Dokazano je da se u uslovima stresa (prekomerno UV zračenje, oštećenje tkiva, infekcija) u biljkama indukuje sinteza polifenolnih jedinjenja (Britton, 1983; Dixon i Paiva, 1995). Polifenolna jedinjenja se mogu akumulirati pre i posle napada mikroorganizama. Pre infekcije su u formi toksina, dok su postinfekcijska polifenolna jedinjenja u formi tzv. fitoaleksina. Među polifenolnim toksinima i fitoaleksinima najvažniji su hidrosikumarini, derivati hidroksicimetine kiseline i flavonoli (Strack, 1997). Pokazano je da su flavonoidi izuzetno značajni i efikasni "havatači" slobodnih radikala u biljnom tkivu. Zbog toga se oni koriste i od strane čoveka u obliku različitih preparata biljaka (čajevi, crno vino i sl.), jer su se pokazali kao veoma jaki antioksidansi. Pored toga, oni su veoma važni u životu čoveka radi zaštite od kancera, kao i u prevenciji koronarnih i drugih oboljenja (Marin, 2003).

Najnovija istraživanja u oblasti hemije, biohemije i medicine potvrđuju da ekstrakti biljaka sadrže fenolne kiseline, flavone, izoflavone, flavanole, katehine, tokoferole, tanine, terpena, te da pokazuju antineoplastična, antiviralna, antiinflamatorna, antialergijska i antioksidativna svojstva (Capasso i sar., 2005). Fenolne komponente toksično deluju na mikroorganizme, a mehanizam delovanja obuhvata inhibiciju oksidovanih komponenti, kao i moguću reakciju sa sulfhidrilnim grupama kroz više nespecifičnih reakcija sa proteinima. Autori Kuntz i sar. (1999) su utvrdili da polifenoli mogu imati značajnu ulogu u prevenciji raka debelog creva blokiranjem hiper-proliferacije epitela potpomažući apoptozu.

Najvažnija dejstva fitohemikalija (Lampe, 1999) su:

- Antioksidativna aktivnost;
- Modulacija enzima koji učestvuju u detoksifikaciji;
- Sprečavanje agregacije trombocita;
- Promene u metabolizmu holesterola;
- Kontrola koncentracije steroidnih hormona i endokrinog metabolizma;

- Redukcija krvnog pritiska;
- Antibakterijsko i antivirusno dejstvo.

Kao što je pomenuto, predstavnici familije Apiaceae se karakterišu prisustvom kumarina. Furanokumarini su pronađeni u listovima biljaka koje pripadaju rodovima *Angelica*, *Seseli* i *Peucedanum*. U semenima 130 vrsta detektovano je prisustvo ovih jedinjenja, za šta se može reći da upravo ova jedinjenja karakterišu čitavu familiju Apiaceae. Biološka aktivnost kumarina je višestruka. Ksantoksin i drugi furanokumarini igraju značajnu ulogu u samim biljkama. To su fitoaleksini koji poseduju antifungalno i antibakterijsko dejstvo. Derivati heraklenola, izoimperatorina, imperatorina, felopterina, biakangelicina, skopoletina i psoralena predstavljaju aktivne antimikrobne komponente. Pokazano je da dihidrobergamotin i bergamotin inhibiraju biofilmove kod patogena. Kumarini su klasični antikoagulansi. Jedinjenja kao što su 8-hidroksibergapten i aloizoimperatorin pokazuju visok stepen uklanjanja slobotnih radikala. Imperatorin deluje hepatoprotektivno, dok kumarin ostol pokazuje antiproliferativni, anti-inflamatorni, antimikrobni i antialergijski efekat (Sieniawska i Glowniak, 2011).

### **1.4.3. Taksonomski značaj polifenola**

Boja cvetova i drugih biljnih organa se veoma malo koristila kao čvrst taksonomski karakter u sistematici. Ovi parametri mogu biti jako varijabilni, jer na njih mogu uticati različiti ekološki faktori. Poznato je da sasvim različiti pigmenti mogu da daju istu boju cveta. Treba naglasiti da je boja cveta, ploda ili drugog organa rezultat prisustva većeg broja različitih pigmenata i kopigmenata. Flavonoidi se često koriste u sistematici zbog svoje hemijske stabilnosti, velikog strukturnog diverziteta, skoro da su univerzalno prisutni kod viših biljaka, relativno lako se mogu identifikovati i što je najbitnije svaka vrsta sadrži bar nekoliko različitih flavonoida (Marin, 2003).

## **1.5. Mikroorganizmi**

### **1.5.1. Opšte karakteristike mikroorganizama**

Mikroorganizmi predstavljaju jednu veoma heterogenu grupu organizama koja obuhvata viruse, bakterije, mikroalge, mikrogljive i protozoe. Mikroorganizmi mogu biti acelularne građe, prokarioti i eukarioti; jednoćelijski, višećelijski i cenocitični; pokretni i nepokretni; autotrofi i heterotrofi (među kojima su i saprofiti, paraziti i obligatni intracelularni paraziti). Međutim, sve pripadnike ove veoma heterogene grupe karakteriše nekoliko zajedničkih osobina, pre svega, male dimenzije (*micro* - mali), velika brzina razmnožavanja i velika sposobnost metaboličke adaptabilnosti (Batzing, 2001).

Bakterije su najzastupljenija grupa mikroorganizama u prirodi. One su kosmopoliti, uglavnom saprofiti ili paraziti, ali ima i autotrofnih predstavnika. Osim toga, one su ubikvitarni organizmi koji naseljavaju sve životne sredine, zemljište, vodu i vazduh, a sreću se i u sredinama koje su nepovoljne za život drugih organizama, kao što su sredine sa visokim salinitetom, aciditetom ili alkalitetom, visokim (termalni izvori) ili niskim temperaturama (sneg i led). Mikroflora zemljišta učestvuje u transformaciji biljnih ostataka (humifikacija), razlaganju humusnih materija, razlaganju minerala matičnog supstrata i stvaranju minerala. Bakterije vodenih ekosistema obavljaju proces samoprečišćavanja (autopurifikacije) vode. Osim toga, u svim sredinama koje naseljavaju, bakterije neprestano stupaju u različite odnose sa drugim mikroorganizmima, biljkama, životinjama i čovekom (Mihajilov-Krstev, 2009).

### **1.5.2. Patogeni mikroorganizmi**

Patogenost mikroorganizma se, u širem smislu, može definisati kao njegova sposobnost da prodire u organizam domaćina, da se u njemu održava, razmnožava i izaziva bolest. U užem značenju patogenost predstavlja *sposobnost infektivnog agensa da izaziva oboljenje* (Jawetz i sar., 2007). Ubrajaju se u urođene (genetski

determinisane) morfofiziološke osobine u koje spadaju kako način ishrane tako i disanje, tip fermentacije, produkcija pigmenata ili flagela (Karaklašević, 1977).

Stepen patogenosti naziva se *virulencija* (od latinske reči *virulentia* – otrovnost) i predstavlja kvantitativnu sposobnost agensa da izaziva oboljenje – virulentni agens izaziva oboljenje i onda kada u domaćinu dospe u malom broju. Virulencija u sebe uključuje adherenciju, invaziju i toksičnost (Jawetz i sar., 2007). Taj termin je uveden u upotrebu još u vreme, kada se virulencija izjednačavala sa patogenošću i toksičnošću, tj. kada se verovalo da su mikroorganizmi koji izazivaju zarazna oboljenja toksični. Zbog toga treba istaći da je patogenost mikroorganizama genetski determinisana, postojana osobina date vrste mikroorganizama (skup kvaliteta), a da je virulentnost kvantitet tih kvaliteta kod pojedinih sojeva date vrste. Virulentnost zavisi kako od genetskih predispozicija za patogenost određene vrste mikroorganizama tako i od faktora i mehanizama odbrane domaćina (njegove otpornosti ili rezistencije). Osim toga, na virulenciju utiču i faktori spoljašnje sredine. Većina bakterija, posle dužeg čuvanja u laboratorijama na veštačkim hranljivim podlogama, delimično ili potpuno izgubi svoju virulenciju. Ukoliko je taj gubitak trajan, takvi mikroorganizmi se nazivaju *atenuisani mikroorganizmi*.

Virulencija se može odrediti samo u živom organizmu domaćina. Postoji više metoda za određivanje virulencije, ali su sve zasnovane na određivanju broja ćelija ili količine toksina nekog patogenog mikroorganizma, koji u inokulisanim laboratorijskim životinjama, izazivaju neku patološku promenu ili smrt. Najmanji broj ćelija ili najmanja količina toksina, koji izazivaju smrt ili neki drugi patološki efekat kod svih inokulisanih životinja, nazivaju se *minimalna efikasna doza* (MED) ili *minimalna letalna doza* (MLD). Što je MED, odnosno MLD nekog patogenog soja manji - to je on virulentniji, a što je veći - to je on manje virulentan.

Patogenost i virulentnost mikroorganizama s jedne strane, i otpornost i osetljivost domaćina s druge strane, predstavljaju međusobno uzročno povezane biološke fenomene (Karaklašević, 1977).

### 1.5.3. Uloga mikroorganizma u infektivnom procesu

Infekcija (naziv potiče od latinske reči *infectio* - zaražavanje) označava "stanje zaraženosti koje je nastalo kao rezultat antagonističkog odnosa između mikro- i makroorganizma u uslovima okolne sredine" (Radev i sar., 1988). Preciznije, infekcija podrazumeva multiplikaciju infektivnog agensa (patogenih bakterija) u telu domaćina čak i kada nema vidljivih simptoma oboljenja.

Uloga mikroorganizama u infektivnom procesu je bazirana na njegovoj patogenosti, koja predstavlja skup genetski determinisanih osobina, čiji stepen ekspresije, virulentnost, zavisi od otpornosti domaćina.

Među patogenima se mogu uočiti dve grupe mikroorganizama i to: patogeni paraziti i patogeni saprofiti. *Patogeni paraziti* koriste za svoju ishranu žive ćelije ili esencijalne metabolite svog domaćina, od koga su stalno ili povremeno potpuno zavisni. *Patogeni saprofiti* žive u okolnoj sredini i u organizam domaćina dospevaju pasivnim putem (najčešće u vidu spora preko rana ili konzumiranjem zaražene vode ili hrane).

U toku evolucije patogeni mikroorganizmi su razvili različite mehanizme putem kojih deluju na domaćina. To su:

- 1) obrazovanje spora (tetanusni i antraksni bacil), kapsula (pneumokoke, diplokoke i dr.) i organela za kretanje (enterobakterije, vibroni kolere, spirohete i dr.);
- 2) izlučivanje enzima (streptokinaza – protiv fibrinske barijere, hijaluronidaza – protiv hijaluronske kiseline vezivnih tkiva, neurominidaza – razgrađuje mukopolisaharide ćelijskog omotača epitela disajnih puteva, hemolizini, fibrinolizini, plazmokoagulaza i dr.);
- 3) izlučivanje toksičnih materija – egzotoksina, sa afinitetom za određena tkiva (tetanusni, difterijalni, botulin toksin) i endotoksina koji prouzrokuju opštu intoksikaciju i alergijske reakcije (endotoksini enterobakterija, šigela, salmonela, rikecija i dr.). Egzotoksini se izlučuju pri životnim procesima bakterija, a endotoksini prilikom njihovog liziranja (Radev i sar., 1988).

Svi navedeni faktori patogene aktivnosti mikroorganizama se mogu grupisati u dve grupe. Jedna grupa im obezbeđuje invazivnost, a druga toksičnost.

**Invazivnost mikroorganizama** olakšavaju faktori koji inhibišu fagocitozu, kao što su:

- kapsula – neke bakterije oko svojih ćelija proizvode kapsulu koja ih štiti od štetnih uticaja spoljašnje sredine, a u tkivima domaćina od fagocitoze. Hemijski sastav kapsule može biti različit. Fagociti mogu da fagocitiraju inkapsulirane bakterije, ali ne mogu da ih razgrade. Osim toga, oni ih putem krvi raznesu do ostalih delova tela domaćina, tako da pospešuju širenje patogenih bakterija. Mnoge bakterije proizvode različite omotače (M-protein kod streptokoka, Vi-antigen kod salmonela) koje inhibišu fagocitozu;
- koagulaza – patogene loze stafilokoka, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i druge bakterije, proizvode koagulu koja ubrzava koagulaciju krvne plazme. Formirani fibrin se istaloži na površini bakterijskih ćelija i oko njih formira ovojnicu koja ih štiti od fagocitoze;
- leukotoksini – neke patogene bakterije proizvode leukotoksine, koji svojom toksičnom aktivnošću ubijaju ili oštećuju fagocite i na taj način inhibišu fagocitozu;
- bakterijske kinaze – neke bakterije proizvode kinaze (streptokoke proizvode streptokinaze, stafilokoke proizvode stafilokinaze) koje aktiviraju plazmin (plazma-proteaza);
- hijaluronidaza ili faktor prodornosti – mnoge patogene bakterije (streptokoke, stafilokoke, pneumokoke i klostridijumi gasne gangrene) proizvode enzim hijaluronidazu koja razgrađuje hijaluronsku kiselinu, vezivnu materiju u tkivima. Na taj način je olakšano širenje patogena kroz telo domaćina;
- kolagenaza – enzim koji razgrađuje kolagen mišića (na želatin i mišićno tkivo ne deluje) i tako bakterijama otvara puteve za njihovo dalje širenje po organizmu. Kolagenazu u velikoj meri proizvode bakterije roda *Clostridium*.

**Toksičnost patogenih bakterija** je bazirana na njihovoj sposobnosti da sintetišu toksine. U zavisnosti od toga, da li ih izlučuju u spoljašnju sredinu ili ih čuvaju vezane za ćelijsku supstancu, toksini bakterija se dele na egzotoksine i endotoksine.

- *Egzotoksine* sintetišu i izlučuju žive i fiziološki normalne patogene bakterije. Oni su po svojoj hemijskoj prirodi proteini i njih dezintegrišu svi faktori koji vrše denaturaciju proteina: visoke temperature, UV zračenje, soli teških metala, proteolitički enzimi, jake kiseline ili baze.

- *Endotoksini* su sastavni delovi ćelija nekih bakterija. Njih bakterije ne mogu da izluče u svoju okolinu, već se oni oslobađaju tek nakon liziranja bakterijskih ćelija. Endotoksini su kompleksna jedinjenja velikih molekula (kod šigela, salmonela, ešerihija i drugih Gram-negativnih bakterija endotoksini su glicidolipidopolipeptidski kompleksi) koji su otporni na faktore denaturacije proteina (Karaklašević, 1977).

#### **1.5.4. Opis testiranih mikroorganizama**

U odnosu na ukupan broj do sada opisanih mikroorganizama možemo reći da uzročnici oboljenja čoveka i životinja čine relativno mali broj. U daljem tekstu biće opisani pojedini rodovi i vrste čiji su sojevi poznati kao glavni uzročnici velikog broja bolesti koji su od velikog značaja za humanu i veterinarsku medicinu.

#### **Gram-negativne bakterije**

##### **Rod *Escherichia***

Ovaj rod je dobio ime po Theodoru Escherichu koji je prvi izolovao i opisao tipsku vrstu ovog roda. To su pravi štapići, pojedinačni ili u parovima, kapsule i mikrokapsule prisutne kod mnogih sojeva, Gram-negativne, pokretne (peritrihe) ili nepokretne, aerobi i fakultativni anaerobi koji imaju i respiratorni i fermentativni tip metabolizma. Hemoorganotrofi su i oksidaza negativni.

##### ***Escherichia coli* Migula**

*Morfologija:* Kratki Gram-negativni štapići dužine 2.0-6.0  $\mu\text{m}$ , širine 1.0-1.5  $\mu\text{m}$  (kada se oboje dimenzije im se skraćuju) (**Slika 1.5.4**). Javljaju se pojedinačno ili u parovima. Većina sojeva ima peritrihalne flagele i pokretne su. Mnogi sojevi poseduju mikrokapsulu, a mnogi imaju brojne fimbrije.





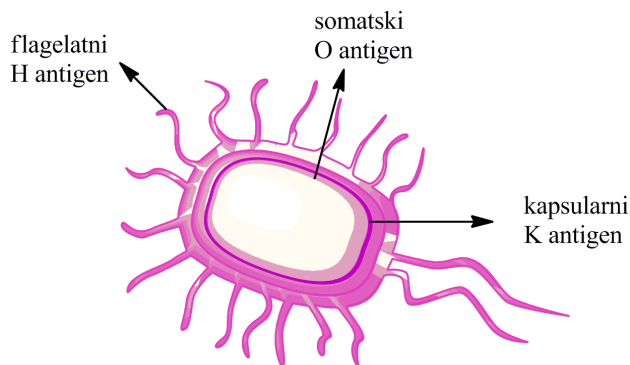
**Slika 1.5.4. *Escherichia coli***

*Kulturelne osobine:* *Escherichia coli* je aerobna i fakultativno anaerobna bakterija. Raste dobro na svim jednostavnim podlogama. Kolonije su najčešće srednje veličine, okrugle, konveksne, glatke, sjajne, providne i bezbojne. Neki sojevi imaju mukoidne kolonije. Na endo- i eozin-metilenskoplavom agaru kolonije imaju metalni sjaj. *Escherichia coli* difuzno boji bujon.

*Otpornost:* *Escherichia coli* je prilično otporna. Mesecima može opstati u vodi i zemlji i raznim predmetima. Otporna je na temperature koje su znatno ispod 0°C, a toplota od 60°C ih ubija posle 15-20 min. Veoma je osetljiva na hlor i hlorna jedinjenja.

*Toksičnost:* Kod *Escherichia coli* je utvrđeno više toksičnih materija: endotoksin (glicidolipidopolipeptidinski kompleks koji je i O-antigen); enterotoksin (termolabilan je i deluje tako što vodu i jone tera u lumen creva i izaziva prolive sa teškim dehidratacijama); hemolizini ( $\alpha$ -hemolizin koji je termolabilan i rastvorljiv i  $\beta$ -hemolizin koji je vezan za ćeliju).

*Antigenska struktura:* Bakterije vrste *Escherichia coli* imaju tri antigena: somatski O-antigen (termostabilan); flagelatni H-antigen (termolabilan) i kapsularni K-antigen (**Slika 1.5.5**).



**Slika 1.5.5. Struktura *E. coli* sa faktorima virulencije**

O-antigen je povezan sa ćelijskim zidom kao polisaharidna komponenta lipopolisaharida (LPS) i prisutan je kod većine rodova porodice Enterobacteriaceae. Na osnovu njega se razlikuju serotipovi mnogih enteričnih Gram-negativnih bakterija. H-antigen je asociran sa flagelama te ga poseduju samo pokretne bakterije ove porodice kao što je *E. coli*. K-antigen je asociran sa kapsulama ili ređe sa fimbrijama. U okviru *E. coli* vrsta se, na osnovu O, H i K-antigena, razlikuje se veliki broj serotipova koji su povezani sa različitim oboljenjima. Na primer, serotip koji ima O157 i H7 antigene (poznat kao O157:H7) izaziva nekoliko oblika hemoragičnog kolitisa (Strohi i sar., 2001).

*Patogenost za ljude: Escherichia coli* je normalni deo mikroflore crevnog trakta toplokrvnih životinja. Naseljava crevni trakt čoveka gde sintetiše vitamine (B12), antibiotike (kolicin), učestvuje u transformaciji ugljenih hidrata i proteina. Kada oslabi imuni sistem, izaziva crevne poremećaje (enteritis). Takođe je i glavni uzročnik infekcija urinarnog trakta, sepsikemije i meningitisa, ali izaziva i pneumonije (u organizam domaćina dospeva aspiracijom orofaringealnog sekreta).

*Antibiotska terapija:* Kao i ostale Gram-negativne bakterije i *E. coli* je rezistentna na hidrofobne antibiotike kao što su makrolidi, novobiocini, rifamicini, aktinomicin D i fusidinska kiselina. Za to su odgovorne spoljašnja membrana koja je slabo propustljiva za lipofilne komponente kao i mehanizam njihovog aktivnog izbacivanja iz bakterijske ćelije (Nikaido, 1994). Sva oboljenja koja izaziva *E. coli* obično se leče sulfonamidima, ampicilinom, cefalosporinima i tetraciklinima.

### **Rod *Enterobacter***

Ovaj rod prvi su predstavili Hormaeche i Edwards (1960). Predstavnici ovog rodu su fakultativni anaerobi, štapićastog oblika. Pojedini sojevi mogu biti patogeni. Najčešće izazivaju oboljenja respiratornog i urinarnog trakta.

#### ***Enterobacter cloacae* Jordan**

*Morfologija:* Gram-negativni štapići (**Slika 1.5.6**).

*Kulturelne osobine:* Rastu anaerobno na temperaturi od 30°C. Kao hranljiva podloga pogodna za njihov rast koristi se hranjivi agar.



**Slika 1.5.6. *Enterobacter cloacae***

*Antibiotska terapija:* Ova bakterija je odgovorna za oboljenja respiratornog i urinarnog trakta, zbog čega se koristi gentamicin kao antibiotska terapija (Barnes i sar., 2003).

### **Rod *Salmonella***

Rod je dobio ime po Daniel Elmer Salmonu. Skoro svi mnogobrojni članovi roda su patogeni za ljude i životinje. Zbog oboljenja koja izazivaju u čoveka nazivaju se tifus-paratifus-enteritis grupa (PTE-grupa).

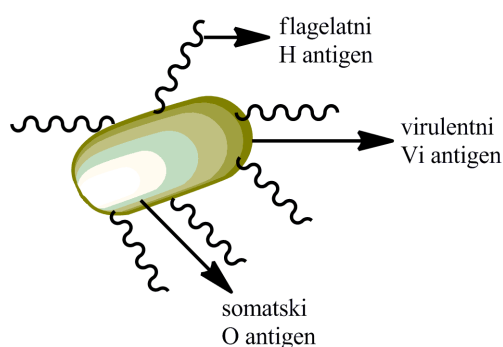
*Morfologija:* Gram-negativni štapići koji su pokretni uz pomoć peritrihalnih flagela (izuzetak su *S. pullorum* i *S. gallinarum* koje su nepokretne), asporogene su i nemaju vidljivu kapsulu.

*Kulturelne osobine:* Rastu na obogaćenim podlogama (MacConkey agar, Wilson-Blairov agar, DCA (dezoksidiholatsko-citratni agar) i SS (*Salmonella-Shigella* agar) u aerobnim i anaerobnim uslovima. Kolonije su im okrugle konveksne, glatke i sjajne, prečnika 2-3 mm. Na Wilson-Blairovom agaru rastu smeđe do crne kolonije sa metalnim sjajem. Na DCA-u rastu bezbojne, nešto plavičaste, prozirne kolonije. Hranljivi bujon sve salmonele difuzno zamućuju. Za njihovu izolaciju iz krvi koristi se dekstrozni bujon.

*Otpornost:* Osetljive su na različite faktore. U ledu i zamrznutoj zemlji ostaju žive preko cele zime, ali ih temperatura od 56<sup>0</sup>C ubija već nakon 20-30 minuta. Osetljive su na hlor, natrijum dezoksiholat i jedinjenja selena.

*Toksičnost:* proizvode endotoksin (ne i egzotoksin) koji je polisaharidno-lipidno-polipeptidni kompleks. On je ujedno i somatski antigen salmonela.

*Antigenska struktura:* Salmonele imaju somatske (O-antigeni koji su termostabilni i označavaju se arapskim brojevima) i flagelatne antigene (proteinske prirode i termolabilni: specifični H-antigeni faze I koji se označavaju malim latinskim slovima i nespecifični H-antigeni faze II koji se označavaju arapskim brojevima). Na površini bakterijske ćelije mnoge salmonele imaju i ovojni ili Vi-antigen (Felix i Pitt su smatrali da su salmonele sa tim antigenom virulentne - *Virulence factor*). Svaki od tih antigena je kompleksan i sastavljen od više antigena. Vrsta *S. enterica* je na osnovu pomenutih antigena podeljena na preko 1500 serotipova (**Slika 1.5.7**) (Strohi i sar., 2001).

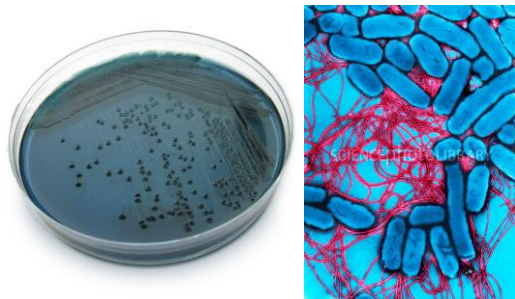


**Slika 1.5.7. Peritrihalne flagele kod roda *Salmonella***

*Patogenost za ljude:* Sve vrste ovoga roda su patogene za ljude i izazivaju razna oboljenja poznata kao salmoneloze koje se mogu podeliti u tri grupe:

1) Opšte ciklične zarazne bolesti – njih izazivaju *S. typhi* i *S. paratyphi* A, B (*S. schottmuelleri*) i C (*S. hirschfeldii*), koje su patogene samo za ljude i uzrokuju trbušni tifus, odnosno paratifusni sindrom.

2) Alimentarne toksikoinfekcije – počinju kao intoksikacije jer se u organizam unesu endotoksini ali može uslediti i infekcija koja se najčešće manifestuje akutnim gastroenteritisom. Njih najčešće izazivaju *S. enteritidis*, *S. tyhimurium*, *S. cholerasuis*, *S. thompson*, *S. newport*, *S. morbifikans bovis*, *S. derby* i *S. anatum* (**Slika 1.5.8, Slika 1.5.9**).



**Slika 1.5.8. *Salmonella enteritidis***



**Slika 1.5.9. *Salmonella tyhimurium***

3) Enteritisi – razvijaju se sporo, ali mogu trajati duže vreme sa sluzavognojnim prolivima koji liče na dizenteričke. Izazivači su serotipovi označeni kao *S. enteritica*, uključuje >2000 serotipova koji uzrokuju gastroenteritis i odgovorni su za 85% svih infekcija salmonelom.

*Antibiotska terapija:* kod gastroenteritisa antibiotska terapija nije potrebna i može produžiti kliconoštvo. Kod enteritisa uspešno deluju  $\beta$ -lactamidi i fluorokvinoloni dok se u slučajevima invazivnih salmoneloza koriste ampicilin, trimetoprim-sulfametoksazol ili cefalosporini treće generacije (Strohi i sar., 2001). Najveći problem je transmisija plazmida između enteričnih bakterija, koji nose gene za rezistentnost na određene antibiotike, zbog čega je za izbor antibiotika neophodan antibiogram test (Jawetz i sar., 2007).

### **Rod *Pseudomonas***

U okviru roda nalaze se pravi ili malo zakrivljeni štapići, nikada helikoidni, Gram-negativni, pokretni – jedna ili nekoliko polarnih flagela, retko nepokretne, aerobne, striktno respiratorni tip metabolizma, organotrofi, neke vrste su fakultativni

hemolitotrofi ( $H_2$  i CO kao izvori energije), široko rasprostranjene u prirodi, neke vrste patogene za čoveka, životinje i biljke (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*).

### ***Pseudomonas aeruginosa* Schröter**

**Morfologija:** štapićasta, Gram-negativna bakterija sa unipolarnom pokretljivošću (**Slika 1.5.10**).

**Kulturelne osobine:** Oksidaza pozitivne,  $\beta$ -hemolitičke bakterije. Produkuju mnoge pigmente kao što su: piocijanin (plavo-zeleni), fluorescein (žuto-zeleni fluorescentni pigment) i piorubrin (crveno-braon). Rastu aerobno i preživljavaju i na temperaturi od  $42^\circ C$ . Nemaju sposobnost fermentacije ugljenih hidrata. Njegova determinacija u odnosu na ostale pripadnike ovoga roda vrši se testiranjem biohemijske aktivnosti sa velikim brojem supstrata (Jawetz i sar., 2007).

**Toksičnost:** Luče endotoksine, egzotoksine, enzime i druge biološki aktivne materije koje povećavaju njihovu toksičnost. Uz pomoć pila (fimbrija) pričvršćuju se za ćelije domaćina. Njihovi lipopolisaharidi su odgovorni za endotoksične sposobnosti organizma. Većina *P. aeruginosa* izolovanih iz kliničkog materijala produkuje ekstracelularne enzime – elastaze i proteaze i dva hemolizina – termolabilnu fosfolipazu C i termostabilni glikolipid (Jawetz i sar., 2007).



**Slika 1.5.10. *Pseudomonas aeruginosa***

**Antibiotska terapija:** Ova bakterija je prirodno rezistentna na penicilin i  $\beta$ -laktamske antibiotike. Ta rezistencija se objašnjava time što ona poseduje složeno građeni ćelijski zid u kome su prisutni porini. Osim toga ona poseduje pumpe, tzv. ABC transportere, koji izbacuju antibiotik iz ćelije pre nego što je on počeo da deluje. Ova

bakterija veoma brzo razvija rezistenciju na upotrebljene antibiotike, zbog čega se koristi agresivna antibiotska terapija kombinacijom aminoglikozida i antipseudomonalnog 13-laktama, ili kvinolona (Strohi i sar., 2001).

## **Gram-pozitivne bakterije**

### **Rod *Staphylococcus***

Rod *Staphylococcus* je dobio naziv od grčkih reči *staphylus* – grozd i *coccus* – zrno. Stafilokoki su loptastog oblika, dijametra 0.6–1.0  $\mu\text{m}$ . U preparatima iz kultura poredani su u nepravilnim grozdovima. Gram-pozitivne su, ali patogeni sojevi mogu biti i Gram-varijabilni. Spadaju u grupu veoma otpornih bakterija. Široko su rasprostranjeni u prirodi. Mogu biti patogeni za čoveka i životinje.

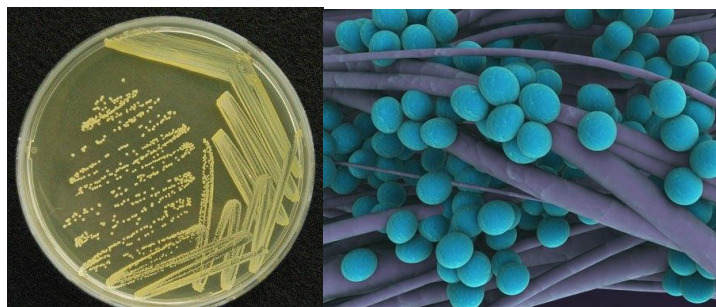
#### ***Staphylococcus aureus* Rosenbach- zlatni stafilokok**

Ova bakterija je dobila ime po žuto-zelenoj boji svojih kolonija. Patogena je i izaziva mnoštvo različitih infekcija i intoksikacija.

**Morfologija:** bakterija loptastog oblika (koka) koja gradi grozdaste formacije (**Slika 1.5.11**). Gram-pozitivna je. Spada u fakultativno anaerobne bakterije, jer joj je za dobijanje energije potreban kiseonik, ali može opstati i bez njega. Čelijski zid zlatnog stafilokoka se sastoji iz debelog sloja mureina sa kojim je asocirana tejhojna kiselina i polisaharidi. Osim toga, on sadrži još neke supstance (npr. protein A) koje imaju ulogu u izbegavanju odgovora odbrambenog sistema i olakšavaju širenje ove bakterije (poseduje proteine koji se vezuju za tkivne proteine kolagen i fibronektin). U ćelijskoj membrani sadrži lipotejhojnu kiselinu. Ove supstnce mogu da aktivišu sistem komplemenata (deo odbrambenog sistema) i makrofage.

**Otpornost i toksičnost:** *Staphylococcus aureus* produkuje i oslobađa mnoge enzime i toksine: Sintetiše intracelularne (protein A, faktor nagomilavanja, fibronektin vezujući protein) i ekstracelularne metabolite ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  toksini i superantigeni egzotoksini). Enterotoksini (A-E, H, G i I) se nalaze u pokvarenim namirnicama. Nastaju vrlo brzo i otporni su na toplotu (ne denaturišu se na temperaturi od 100°C i nakon više od 30 min). Spadaju u superantigene.





**Slika 1.5.11. *Staphylococcus aureus***

*Patogenost za ljude:* *Staphylococcus aureus* često naseljava kožu i sluzokožu (pogotovo sluzokožu nosa), naročito kod bolničkih pacijenata. Bolesti koje izaziva ovaj stafilokok mogu biti invazivne (nastaju prodorom bakterije u organizam), intoksikacijske (bakterije ne prodiru u organizam već izlučuju toksine koji su odgovorni za poremećaje, npr. konzumiranjem pokvarenih namirnica) i kombinacija ove dve grupe.

*Antibiotska terapija:* u terapiji se koriste antibiotici koji su stabilni na dejstvo laktamaze koja razlaže i inaktiviše neke peniciline. U tom smislu se koriste  $\beta$ -laktamaza rezistentni penicilini kao što su nafcilin i oksacilin. Široka primena antibiotika je dovela do selekcije mnogih rezistentnih sojeva. Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) je jedan od najpoznatijih primera. On izaziva bolničke infekcije kod ljudi sa oslabljenim imunitetom. Na njega deluje svega nekoliko antibiotika (glikopeptidi kao što je vankomicin) te se takvi pacijenti moraju izolovati i tako sprečiti širenje infekcije unutar bolnice (Strohi i sar, 2001).

### **Rod *Micrococcus***

Za ovaj rod karakteristično je to da tu spadaju Gram-pozitivne loptaste bakterije, dijametra od 0.5-3  $\mu\text{m}$ . Osnovna karakteristika ovih bakterija je debeo ćelijski zid (Siems i sar., 1986). Sreću se na različitim mestima: voda, prašina, zemljište. Izolovane su sa površine ljudske kože, iz životinjskih i mlečnih proizvoda, kao i iz piva. Mogu opstati u okruženju koje je siromašno vodom ili u sredini sa visokom koncentracijom soli (Greenblat i sar., 2004; Sims i sar., 1986).

Uglavnom su saprofiti ili komensali, retko patogeni, jer se sreću u normalnoj mikroflori kože čoveka (Smith i sar., 1999).



### ***Micrococcus flavus* Cohn**

**Morfologija:** Bakterije ove vrste su sferičnog oblika, 0.7-1.0  $\mu\text{m}$  i nepokretne su. Gram-pozitivne, aerobne i heterotrofne.

**Kulturelne osobine:** Formiraju žute, glatke i kružne kolonije. Rastu na temperature od 30.5-31.5°C, a pH vrednost iznosi od 6-6.2. Katalaza i oksidaza su pozitivne (Xing-Yu i sar., 2007).

### **Rod *Bacillus***

U ovaj rod spadaju krupne Gram-pozitivne štapićaste ćelije sa zaobljenim krajevima, koje se javljaju pojedinačno, u parovima ili u vidu lanaca. Većina su pokretne, neke stvaraju kapsulu. Aerobne su ili fakultativno aerobne, katalaza pozitivne. Većina vrsta roda *Bacillus* su saprofiti koji su široko rasprostranjeni u zemljištu, na biljkama, u vodi i vazduhu. Izuzetak je *Bacillus anthracis* koji je patogen, mada i rodovi *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. megatherium* mogu biti uslovno patogeni. *B. thuringiensis* je patogen insekata i koristi se u njihovoj kontroli.

### ***Bacillus cereus* Frankland & Frankland**

**Morfologija:** *Bacillus cereus* je bakterija koja formira spore (**Slika 1.5.12**).

**Toksičnost i patogenost za ljude:** Prouzrokuje dva posebna sindroma. Jedan je sindrom kratke inkubacije sa povraćanjem, a drugi je period duge inkubacije sa dijarejom. Emetički sindrom ima inkubacioni period i kliničku sliku sličnu trovanju hranom koju izaziva *S. aureus*, sa mučninom i povraćanjem i nastaje posle 1–6 sati nakon inkubacije. Emetički toksin je termostabilan i otporan na proteaze i varijacije pH. Toksin koji je povezan sa drugim sindromom je termolabilan i osetljiv na tripsin (Schechter, 2004).



**Slika 1.5.12. *Bacillus cereus***

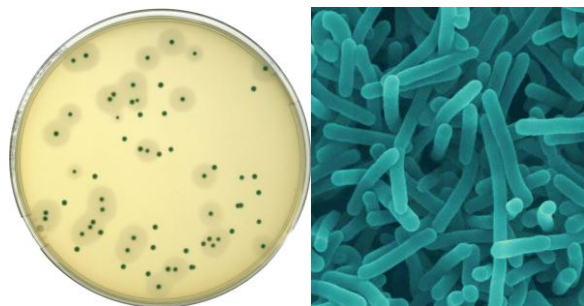
## **Rod *Listeria***

*Listeria* vrste su Gram-pozitivne, asporogene, mikroaerofilne bakterije koje su sposobne da rastu u opsegu temperatura od 4-37°C. Nalaze se u zemljištu, sirovoj hrani i proizvodnom okruženju. Najznačajnija vrsta kao uzročnik infekcija ljudi i životinja (listerioza) je *Listeria monocytogenes*. Za bezbednost namirnice je važna činjenica da je ova bakterija sposobna da se razmnožava na temperaturi hlađenja (Dimić i sar., 2010).

### ***Listeria monocytogenes* E. Murray et al.**

*Morfologija:* *Listeria monocytogenes* je Gram-pozitivni, fakultativni intracelularni patogen koji se unosi najčešće putem hrane (Ramaswamy i sar, 2007).

*Kulturelne osobine:* Veoma je pokretna na temperaturi od 20°C, dok na temperaturi od 37°C prestaje sa kretanjem. Mogu biti kultivisane na krvnom agaru. Široko su rasprostranjene (**Slika 1.5.13**).



**Slika 1.5.13.** *Listeria monocytogenes*

*Patogenost za ljude:* *Listeriae* su klasični oportunisti. Kod osoba sa normalnim imunim sistemom, infekcija će biti tiha ili imati kliničku sliku gripa. Kod osoba sa oslabljenim imunim sistemom, oboljenje se manifestuje kao sepsa ili izaziva meningoencefalitis. Ređe, izazivač je endokarditisa. Listerioza tokom trudnoće izaziva spontani pobačaj ili konatalnu listeriozu (Kayser i sar, 2005).

## **Mikromicete**

### **Rod *Candida***

Rod *Candida* je vrstama brojan i vrlo heterogen rod, obuhvata nesavršene forme kvasca, svrstane u podrazdeo *Deuteromycotina* zbog odsustva polnog procesa, mada

neke njihove osobine ukazuju na pripadnost podrazdelima *Ascomycotina* ili *Basidiomycotina*.

Vrste koje pripadaju ovom rodu razmnožavaju se vegetativno - pupljenjem. Usled neodvajanja pupoljaka, obrazuju pseudomiceliju sa različitim stepenom prelaska ka pravoj miceliji. Na pseudomiceliji se uočavaju karakteristična suženja na mestima pregrada. U procesu analognom pupljenju, mogu da formiraju blastospore (Carlile i sar., 2006).

### ***Candida albicans* C.P. Robin**

**Morfologija:** Čelija kandidate je ovalnog oblika, dijametra oko 4  $\mu\text{m}$  (**Slika 1.5.14**). U pitanju je polimorfna vrsta, što znači da može imati više morfoloških formi (blastokonidije i hifalne forme) (Stojanović-Radić, 2011).

**Patogenost za ljude:** *Candida albicans* izaziva oboljenja poznata kao kandidiaze. Zajedno sa ostalim vrstama ovoga roda nalazi se u koži, ustima, vagini i crevima kao normalna telesna flora. Infekcije nastaju onda kada ostala bakterijska kompetitorska flora biva limitirana upotrebom antibiotika koji nemaju fungicidno delovanje. Postoje oralne, vaginalne i sistemske kandidiaze koje se mogu manifestovati na različite načine.



**Slika 1.5.14. *Candida albicans***

**Antibiotska terapija:** Oralne i vaginalne kandidiaze se, pre svega, leče nistatinom i klotrimazolom, zatim ketonazolom, flukonazolom i itrakonazolom. Za lečenje sistemske kandidiaze koristi se amfotericin B, sam ili u kombinaciji sa flucitozinom (Strohi i sar., 2001).

### **Rod *Aspergillus***

Gljive iz roda *Aspergillus* izazivaju plesni na različitim supstratima. Konidiofori su im jednoćelijski, nerazgranati, sa loptastim proširenjima na vrhu zvanim vezikula. Od

njih su radijalno raspoređene fjalide (flašolike tvorevine), a na njima nizovi jednoćelijskih konidija.

U odgovarajućim uslovima gljive predstavnici roda *Aspergillus* mogu da uzmu učešće u pojavi plesnivosti semena, plodova i raznih proizvoda. Neke vrste su patogene za čoveka i životinje izazivajući bolesti tipa aspergiloze.

U industriji se koriste za dobijanje fermentata, organskih kiselina i antibiotika (Ranković, 2003).

### ***Aspergillus niger* van Tieghem**

**Morfologija:** Konidijalne glavice mrke, okrugle, radijalne (**Slika 1.5.15**). Vezikula takođe okrugla, kod mladih konidijalnih glavica prisutne su samo fjalide, kod starijih i profijalide i fjalide. Konidiofori dugački, duži od 3 mm. Konidije okrugle, hrapave, 3.5-5 µm. Mogu obrazovati sklerocije krem boje (Raper i Fennell, 1952). Kosmopolitska je vrsta.

**Kulturelne osobine:** Brzo rastuća kolonija na selektivnim mikološkim podlogama. Na CzA podlozi, pri temperaturi od 25°C, kolonija je bela ili žuta sa mnoštvom braon crnih glavica, koje daju karakterističan izgled celoj koloniji. Izolovana iz vazduha, suvih semena, plodova, tekstila. Temperaturni opseg za rast je 20-40°C, optimum razvića na 37°C. Učestvuje u produkciji različitih enzima - amilaze i amiloglukozidaze; u produkciji oksalne i fumarične kiseline; u industriji za razlaganje plastike i celuloze.



**Slika 1.5.15. *Aspergillus niger***

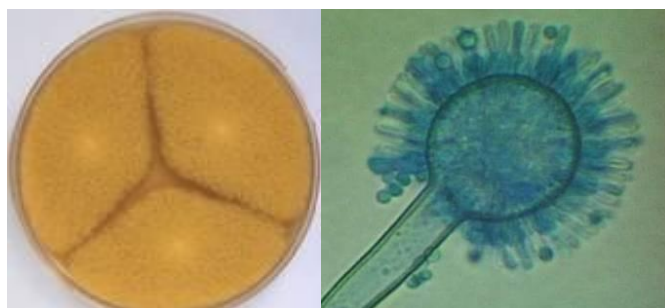
**Patogenost:** *Aspergillus niger* je čest uzročnik kvarenja hrane, inficira meso i jaja. Prisutna u zemljištu i raspadajućem biljnom materijalu, prouzrokovatelj crne plesni luka (Ellis i Ellis, 1997). Izazivač infekcija očiju kod ljudi i pojavu alergijskih reakcija, usled

inhalacije spora. Producent mikotoksina (malformin C, nafto-kinon) (Gravsen i sar., 1994).

### ***Aspergillus ochraceus* Wilhelm**

**Morfologija:** Konidije okruglaste ili eliptične, prečnika 2.5-3.0  $\mu\text{m}$ , sa glatkim zidovima (**Slika 1.5.16**). Nepravilno oblikovane sklerocije često prisutne, bele, kasnije tamnije-purpurne (Škrinjar, 1979). Široko rasprostranjena vrsta u tropskim i subtropskim arealima ali se takođe nalazi i u Evropi u različitim tipovima

**Kulturelne osobine:** Na CzA kolonija dostiže prečnik 2.5-3.5 cm za 7 dana na temperaturi od 25°C. Konidijalne glavice su oker žute boje. Vezikule okrugle ili eliptične, potpuno fertilne obrasle profijalidama i fijalidama. Izolovana je iz vazduha i kućne prašine. Temperaturni opseg za rast 12-27°C, optimum 27°C. Koristi se za biološku kontrolu vrsta rodova *Fusarium* i *Verticillium*, degradaciju n-alkana i transformaciju sterola.



**Slika 1.5.16. *Aspergillus ochraceus***

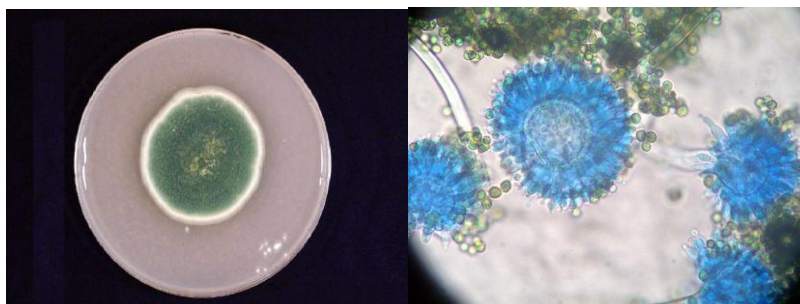
**Patogenost:** Ova gljiva izaziva flekavost i truljenje drveta, duvana, pamuka i dr. Napada insekte, najčešće svilenu bubu. Od mikotoksina produkuje ohratoksin A koji izaziva kvarenje hrane, oštećenje jetre kod domaćih životinja i ljudi; i ksantomegnin koji oštećuje bubrege i jetru (Gravsen i sar., 1994).

### ***Aspergillus versicolor* (Vuill) Tiraboschi**

**Morfologija:** Konidijalne glavice hemisferične (**Slika 1.5.17**). Konidiofori bezbojni, vezikula hemisferična ili semieliptična, fijalide biserijalne. Konidije su okruglaste, 2-3.5  $\mu\text{m}$  u prečniku (Raper i Fennel, 1952). Pored toplih regiona sreće se i u

umerenom klimatu, halofilna vrsta. Izolovana je sa zobi, konzervirane šunke, vlažnog brašna, poliranog i nepoliranog pirinča a najviše sa sira.

*Kulturelne osobine:* Kolonija na CzA podlozi sporo raste, samo 1-1.5 cm u prečniku za 7 dana, pri temperaturi 25°C. Boja kolonije je u početku bela, zatim žućkasto oranž do žuto zelena, sa ružičastim sektorima, radijalno zonirana. Konidije klijaju na minimalnoj relativnoj vlažnosti vazduha 78% na temperaturi od 4-5°C. Optimalna temperature za rast je 22-26°C a maksimalna 40°C. *A. versicolor* može da koristi ugljovodonike iz pogonskog goriva. Produkuje enzime za razgradnju skroba, celuloze, lipida i proteina. Takođe može da transformiše progesteron u testosteron i druge srodne ketone.



**Slika 1.5.17. *Aspergillus versicolor***

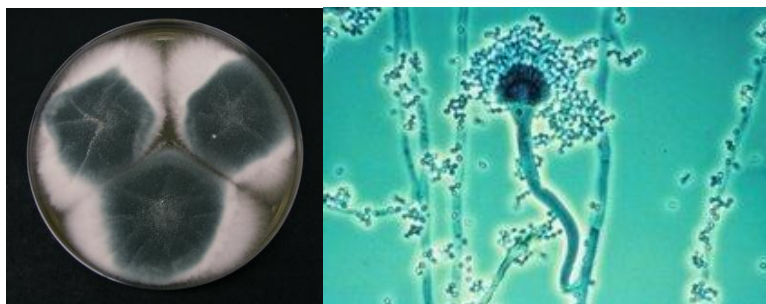
*Patogenost:* Pored drugih vrsta mikromiceta ova vrsta je indikator povišene vlage u kućama, često je izolovana sa vodom oštećenog građevinskog materijala ili tapeta. Ova vrsta je odgovorna za biodegradativna oštećenja vojne opreme i optičkih instrumenata u tropima. Metabolit koji produkuje geosmin - gorkog, oporog mirisa povezan je sa vlagom u kući, iritira oči i nos. Producent je kancerogene supstance sterigmatocistina - može izazvati ozbiljna oboljenja kod stoke (Gravsen i sar., 1994).

#### ***Aspergillus fumigatus* Fresenius**

*Morfologija:* Kolonije gljiva nastaju iz konidijofora, pri čemu se formiraju sivo-zelena konidije (2–3 μm) (O’Gorman i sar., 2008). Saprotrof je široko rasprostranjena u prirodi, nalazi se u zemljištu i u kompostu (**Slika 1.5.18**).

*Kulturelne osobine:* Optimalna temperature rasta iznosi 37°C, međutim sreće se i na temperaturi od 50°C, a kada je u stadijumu konidija preživljava temperature i do 70°C. Spore ovih gljiva se nalaze u vazduhu.





**Slika 1.5.18. *Aspergillus fumigatus***

**Patogenost:** Ovo je gljiva koja je najčešće odgovorna za mnoge bolesti koje nastaju kod osoba sa imunodeficijencijom. Kod zdravih osoba spore se otklanjaju putem imunog sistema, dok kod osoba sa AIDS-om ili leukemijom spore mogu biti patogene i izazivači su bolesti koja se naziva aspergiloza (Cui i sar., 1996).

### **Rod *Penicillium***

Gljive iz roda *Penicillium* obrazuju konidijski aparat koji se sastoji od višćelijskog, ponekad razgranatog stabla označenog kao stipe. Na njemu se nalazi jedno ili dvostruko razgranati penicillus-i (penicillus=četkica). Na vrhu je konidijofor sa granama, a na njemu su fialide sa konidijama.

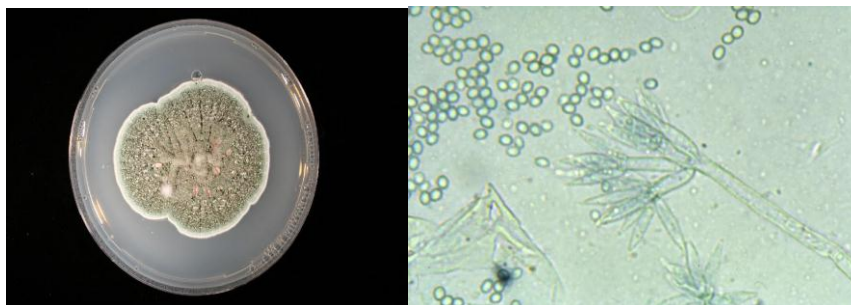
Vrste iz roda *Penicillium* su veoma rasprostranjene zemljišne gljive, koje vrše razgradnju organskih materija. Neke vrste izazivaju truljenje plodova prilikom njihovog čuvanja, dok druge vrste gljiva ovog roda uzrokuju nastanak plesni na kukuruzu i zrnima drugih biljaka, zatim buđanje raznih hranljivih produkata, oštećenja plastičnih masa, metala i drugih materijala. Pojedine vrste su značajne za čoveka, jer su odgovorne za dobijanje penicilina i njemu sličnih antibiotika (Ranković, 2003).

#### ***Penicillium funiculosum* Thom**

**Morfologija:** Konidiofore često veoma kratke, obrazuju se direktno na miceliji, glatke, uglavnom negranate (**Slika 1.5.19**). Metule po 5-8 u grupi nose paralelno grupisane fialide. Konidije eliptične ili okrugle, 2.5-5.0  $\mu\text{m}$  u prečniku, obrazuju dugačke lance (Škrinjar, 1979). Široko je rasprostranjena, često izolovana iz zemljišta.

**Kulturelne osobine:** Na sobnoj temperaturi kolonija veoma brzo raste na standardnim podlogama. Boja kolonije varira u zavisnosti od količine vazdušne micelije

koja je somotasta, obično je žutonarandžasta ili crvenkasta sa eksudacijom u vidu bezbojnih ili svetlo obojenih kapi. Naličje kolonije narandžasto, crvenkasto ili narandžastosmeđe boje.



**Slika 1.5.19. *Penicillium funiculosum***

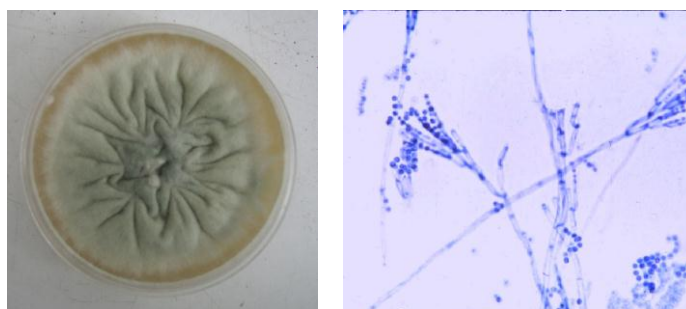
*Patogenost:* Iz ekstrakta ove vrste izolovana su antiviralna jedinjenja, statolon i helenin. Vršiti sintezu celulitičkih enzima. Napada mnoge materijale, naročito tekstil. Produkuje mikotoksine luteoskatin i ciklohlrorin, odgovorne za oštećenja jetre kod eksperimentalnih životinja (Gravsen i sar., 1994).

#### ***Penicillium ochrochloron* Biourge**

*Morfologija:* Široko rasprostranjena. Izolovana iz rastvora bakra, iz zemljišta, iz fuksinske kiseline sa niskim pH vrednostima.

*Kulturelne osobine:* Brzo rastuća kolonija na MA. Micelija je rastresita i somotasta, hife su submerzne. Boja kolonije potiče od konidija koje se razvijaju u ograničenom broju i obično je od beličaste do zelenkasto sive (**Slika 1.5.20**).

*Patogenost:* Oštećuje različite materijale, naročito plastiku i tekstil, otporna je prema solima bakra (Gravsen i sar., 1994).



**Slika 1.5.20. *Penicillium ochrochloron***



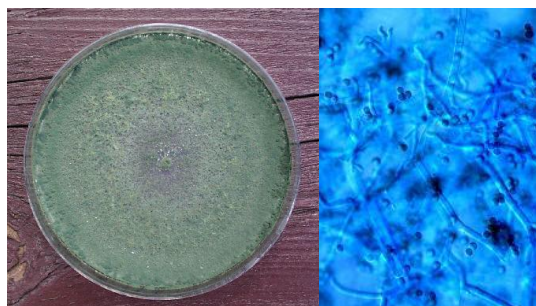
## **Rod *Trichoderma***

Vrste roda *Trichoderma* su prisutne uglavnom u zemljištu. Za njih je karakteristično to da stupaju u simbiozu sa biljkama i na taj način ih brane od patogenih mikroorganizama (Harman i sar., 2004).

### ***Trichoderma viride* Pers.**

*Morfologija:* Konidiofore, uspravne, bezbojne, veoma razgranate, fialide pojedinačne ili u grupama (**Slika 1.5.21**). Konidije jednoćelijske, loptaste, 3.5-4.5  $\mu\text{m}$  u prečniku (Gravsen i sar., 1994). Rasprostranjena u zemljištu, panjevima, oborenom drveću.

*Kulturelne osobine:* Kolonija široko raste i vrlo brzo do 7 cm u prečniku, za 5 dana na 25°C. Boja kolonije je od beličaste, svetlozelene do tamnozelenene. Jedan od prvih kolonizatora stelje, poseduje veoma jaku celulitičku aktivnost. Nalazi se u vlažnim kućama, na zidovima, pločicama u kuhinji. Izolovana je iz vazduha i kućne prašine. Temperaturni opseg za rast 6-32°C, a optimum na 20-28°C.



**Slika 1.5.21. *Trichoderma viride***

*Patogenost:* Otporna je na mnoge antimikotike. Koristi se za proizvodnju celuloze i hemiceluloze. Može da akumulira DDT. Sintetiše supstance sa antibiotskom aktivnošću, koje su toksične za sisare. Izaziva nekrozu korena graška, limuna, paradajza i drugih biljaka. Građevinski materijal oštećen vlagom, celulozni tekstil, plastika i dr. mogu biti kolonizovani ovom vrstom *T. viride* izaziva alergiju tipa 1. Produkuje mikotoksine trikodermin i trikotoksin A (Gravsen i sar., 1994).

## 1.6. Antimikrobna aktivnost

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 (Russell, 2003). U poslednjih nekoliko decenija sve je veća potreba za prirodnim i neškodljivim antimikrobnim supstancama, što je uslovljeno sve češćim razvijanjem rezistencije mikroorganizama na sintetičke antibiotike.

### 1.6.1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata

Za antimikrobnu aktivnost etarskih ulja je važna hemijska struktura pojedinih komponenti. Od najvećeg značaja je lipofilni karakter ugljovodoničnog skeleta i hidrofilni karakter funkcionalnih grupa. Razlika u antimikrobnoj aktivnosti pojedinih komponenta je sledeća: fenoli > aldehidi > ketoni > alkoholi > etri > ugljovodonici (Dorman i Deans, 2000).

Antimikrobna svojstva većine etarskih ulja su bazirana na fenolnim jedinjenjima koja su uglavnom zastupljena sa najvećim procentom u ukupnom ulju (Cosentino i sar., 1999). Međutim, postoje podaci koji ukazuju na to da i malo zastupljene komponente igraju važnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti usled mogućeg sinergističkog delovanja sa ostalim komponentama (Paster i sar., 1995).

Kod fenolnih jedinjenja je dokazano da pozicija hidroksilne grupe u fenolnom prstenu ne utiče mnogo na njihovu antimikrobnu aktivnost. Delovanje timola na *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* je slično kao kod karvakrola (Lambert i sar., 2001; Ultee i sar., 2002). Međutim, postoje i rezultati koji upućuju na različito delovanje timola i karvakrola na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (Dorman i Deans, 2000). Značaj fenolnog prstena (sistem destabilisanih elektrona) se vidi u znatno nižoj aktivnosti mentola u odnosu na karvakrol (Ultee i sar., 2002). Etarska ulja koja imaju veliku količinu jedinjenja sa hidroksilnom funkcionalnom grupom (alkoholi) pokazuju nešto manju aktivnost (ulje čajnog drveta sadrži terpinen-4-ol i  $\alpha$ -terpineol; geranijuma – geraniol i citronelol, nane – mentol, lavande – linalol i linalil-acetat). Acetati, takođe,

pokazuju izvesnu aktivnost – geranil-acetat je aktivniji prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama u odnosu na geraniol (Dorman i Deans, 2000). Aktivne komponente ulja su laktone (El-Ansari i sar., 1995), poliacetileni (Avato i sar., 1997), kao i alifatični alkoholi i aldehidi (Kubo i Lunde, 1995). Kod nefenolnih komponenti etarskih ulja, ustanovljeno je da tip alkil grupe utiče na aktivnost (alkenil > alkil), npr. limonen je aktivniji od *p*-cimena (Dorman i Deans, 2000). Ipak, korelacija između aktivnosti i sastav etarskog ulja još uvek nije dovoljno proučena (Cox i sar., 2001). Pretpostavlja se da je antimikrobna aktivnost etarskih ulja određena više sastavom konstituenata nego njihovom količinom (udelom u ukupnom ulju).

Osim toga, poznato je da se sastav i antimikrobna aktivnost etarskog ulja kod iste vrste može razlikovati između sezona i između različitih geografskih lokaliteta (McGimpsey i sar., 1994; Cosentino i sar., 1999; Juliano i sar., 2000; Faleiro i sar., 2002). Veliki broj istraživanja potvrđuje podatak da etarska ulja, koja se formiraju tokom ili odmah nakon cvetanja, imaju najveći antimikrobni efekat (McGimpsey i sar., 1994; Marino i sar., 1999). Takođe, različitu antimikrobnu aktivnost pokazuju i različiti enantiomeri sastavnih komponenti etarskih ulja, kao i ulja iz različitih delova iste biljke. Zna se da je (-)-pinen aktivniji od enantiomera (+)-pinena (aktivniji prema 18 od 25 ispitivanih različitih bakterijskih sojeva i prema dve od tri filamentne gljive) (Lis-Blachin i sar., 1999). Aktivnost enantiomera karvona i limonena je približno ista (Aggarwal i sar., 2002).

#### **1.6.1.1. Mehanizam antimikrobnog delovanja**

Antibakterijska aktivnost etarskih ulja je konstatovana u mnogim radovima, ali nije detaljno objašnjen njihov mehanizam delovanja. Sa stanovišta velikog broja različitih hemijskih komponenti etarskih ulja, može se pretpostaviti da se njihova aktivnost ne bazira na jednom specifičnom mehanizmu već da postoji nekoliko ciljnih mesta delovanja (Skandamis i sar., 2001; Carson i sar., 2002). Osim toga, pored direktnih (primarnih) efekata koji su posledica delovanja samih ulja, javljaju se i mnogobrojni sekundarni efekti.

Važna osobina etarskih ulja je njihova hidrofobnost usled koje se ona rastvaraju u lipidnom dvosloju bakterijskih ćelijskih membrana dovodeći do njihove promene u

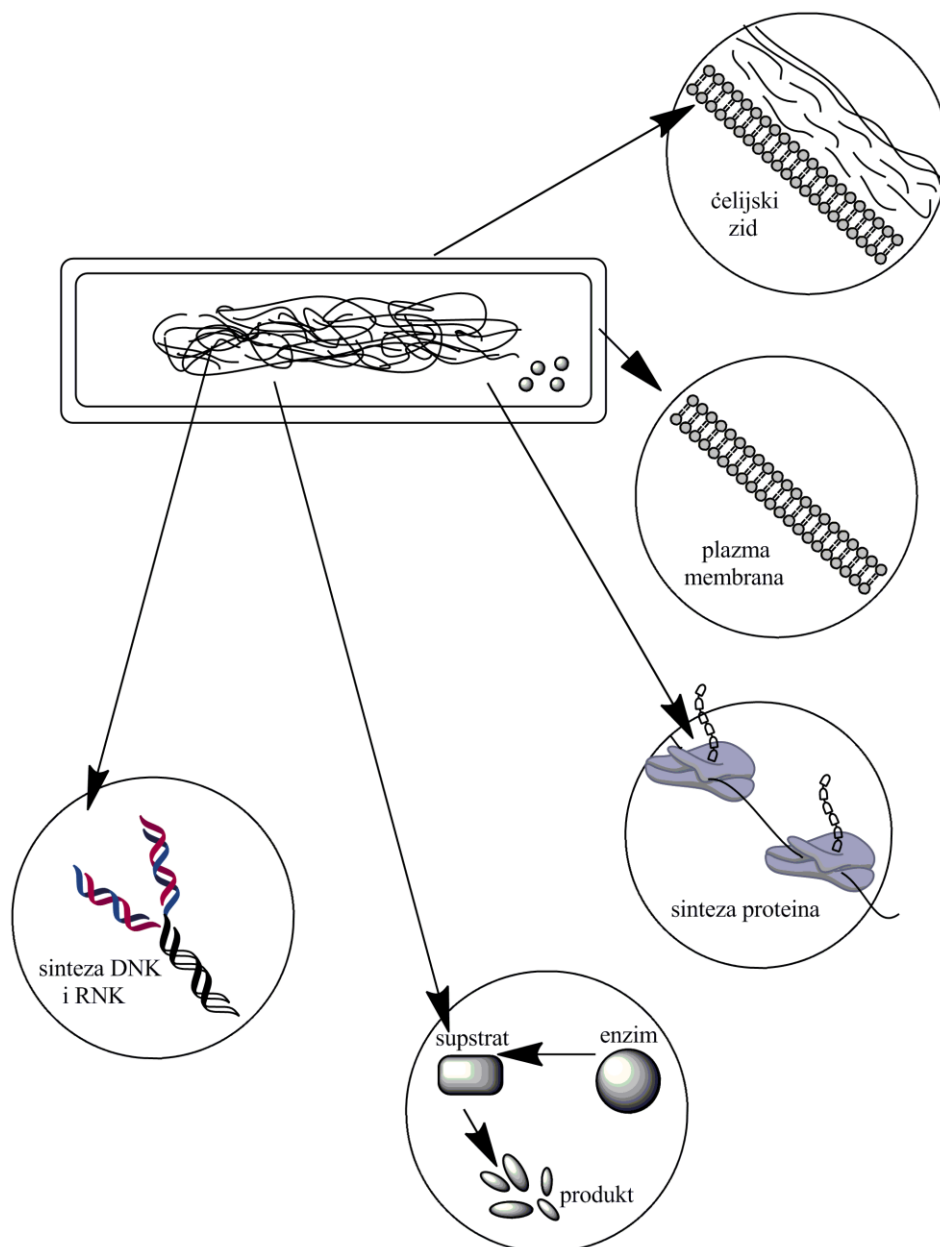
strukturi i permeabilnosti (Sikkema i sar., 1994), što izaziva izlazak jona i drugih ćelijskih komponenti iz ćelije (Cox i sar., 2000; Lambert i sar., 2001; Skandamis i sar., 2001; Carson i sar., 2002; Ultee i sar., 2002; Nguefack i sar., 2004). Usled svega toga, kao sekundarni efekat, nastupa ćelijska smrt (Denyer i Hugo, 1991). Podaci o proučavanju delovanja ulja dobijenog iz čajnog drveta na *E. coli* pokazuju da smrt može nastupiti i pre lize ćelije (Gustafson i sar., 1998).

Generalno etarska ulja poseduju snažnu antimikrobnu aktivnost protiv patogenih bakterija jer sadrže visok procenat fenolnih komponenti kao što su karvakrol, eugenol (2-metoksi-4-(2-propenil)phenol) i timol (Dorman i Deans, 2000; Juliano i sar., 2000; Lambert i sar., 2001; Ben Arfa i sar., 2006).

Njihov mehanizam delovanja je sličan delovanju ostalih fenolnih jedinjenja: reaguju sa citoplazmatskom membranom izazivajući njene lezije i promenu permeabilnosti, što rezultuje u promeni membranskog potencijala, ATP-a, intracelularne pH sredine, tj. pH-gradijenta i efluksu Na<sup>+</sup>-jona (**Slika 1.6.1.1**) (Nguefack i sar., 2004). To je potvrđeno i snimcima na elektronskom mikroskopu kod bakterija *B. cereus* (model-sistem za Gram-pozitivne bakterije) i *E. coli* (model-sistem za Gram-negativne bakterije) (Khadija i sar., 2003) i kod gljive *S. cerevisiae* (Bennis i sar., 2004). Takođe je dokazano da karvakrol snižava produkciju toksina od strane *Bacillus cereus* (Ultee i sar., 2002) i *Clostridium botulinum* (Daifas i sar., 2004). Komponente etarskih ulja utiču i na transport kroz proteinske kanale citoplazmatske membrane (Knobloch i sar., 1989). Cinamon ulje i njegove komponente inhibišu aminokiselinske dekarboksilaze kod *Enterobacter aerogenes* i sprečavaju izgradnju proteina (Wendakoon i Sakaguchi, 1995). Dva su moguća mehanizma na koje ciklični ugljovodonici deluju na njih:

1. Lipofilni molekuli se akumuliraju u lipidnom dvosloju i dovode do distorzije u lipidno-proteiskim interakcijama;
2. Moguća je i direktna interakcija lipidnih komponenti sa hidrofobnim delovima proteina (Sikkema i sar., 1995).

Osim toga što etarska ulja vrše inhibiciju rasta vegetativnih bakterijskih ćelija ona vrše i inhibiciju produkcije toksina. Smith-Palmer i saradnici (2004) su pokazali da etarska ulja nekih biljaka smanjuju patogenost *L. monocytogenes* na taj način što redukuju produkciju listeriolizina O i fosfatidilholin-specifičnu fosfolipazu C, kao i patogenost *S. aureus* redukujući produkciju  $\alpha$ -toksina i enterotoksina A i B.



**Slika 1.6.1.1. Ciljna mesta/procesi na bakterijskoj ćeliji (Gram-pozitivnoj) za delovanje antimikrobnih supstanci: čelijski zid; plazma membrana; sinteza proteina; metabolizam bakterijske ćelije; sinteza nukleinskih kiselina**

Neka etarska ulja stimulišu rast pseudomicelije (nepotpuno odvajanje ćelija nakon deobe) kod nekih gljiva. To ukazuje da etarska ulja deluju na enzime uključene u energetske regulacije sinteze strukturnih komponenti (Conner i Beuchet, 1984).  $\alpha$ -toksini su toksični sekundarni metaboliti gljiva npr. *A. flavus* i *A. parasiticus* koji uzrokuju kontaminaciju hrane. Opasni su po zdravlje jer ispoljavaju kancerogeno,

mutageno i teratogeno dejstvo. Etarska ulja pojedinih biljaka deluju tako da imaju sposobnost ne samo da inhibiraju, već i da u potpunosti spreče dalju produkciju  $\alpha$ -toksina. Sintezu toksina B1 (koji ima najjača kancerogena svojstva) inhibiraju ulja *Azadirachta indica* (Bancole, 1997), ulje geranijuma i matičnjaka (Daw i sar., 1994). Ustanovljeno je da etarska ulja kod gljiva dovode do sličnih promena koje izazivaju antibiotici (Takaisi-Kikuni i sar., 1996).

Etarska ulja dovode i do inhibicije sinteze DNK, RNK, proteina, polisaharida bakterijskih i fungalnih ćelija (Himejima i sar., 1993).

U mnogim studijama je pokazano da su Gram-pozitivne bakterije osetljivije u odnosu na Gram-negativne (Marino i sar., 2001; Juliano i sar., 2000; Lambert i sar., 2001; Harpaz i sar., 2003; Hanamantagouda i sar., 2010; Okoh i sar., 2009). To se objašnjava time što Gram-negativne bakterije poseduju još jednu membranu oko peptidoglikanskog dela ćelijskog zida (Ratledge i Wilkinson, 1988), što smanjuje difuziju hidrofobnih komponenti kroz njihov lipopolisaharidni omotač (Vaara, 1992). Na antimikrobno dejstvo etarskih ulja najslabije je osetljiva bakterija *P. aeruginosa* (Deans i Ritchie, 1987; Cosentino i sar., 1999; Lis-Blachin i sar., 1999; Dorman i Deans, 2000; Wilkinson i sar., 2003; Kalemba i Kunicka, 2003) zahvaljujući tome što je površina njene membrane hidrofilna. Naime, na površini njenih ćelija se formira selektivno propustljiva membrana kroz koju mogu da prolaze mali hidrofilni molekuli, dok hidrofobni makromolekuli (poput onih koji ulaze u sastav etarskih ulja) ostaju sa spoljne strane membrane (Nikaido, 1994).

### **1.6.2. Antifungalna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata**

Upotreba prirodnih antimikrobnih komponenata postala je važna za čuvanje hrane i u kontroli humanih i biljnih bolesti koje su izazvane mikroorganizmima. Test organizmi su, najčešće mikromicete, kontaminatori hrane, fitopatogeni, producenti mikotoksina, izazivači raznih gljivičnih oboljenja životinja i čoveka. Poslednjih godina sintetisan je veliki broj različitih antifungalnih agenasa u cilju tretiranja infektivnih bolesti izazvanih gljivama. Među najefikasnijim su amfotericin B, nistatin, mikonazol, grizeofulvin, bifonazol i drugi (Reddy i sar., 1998). U razvijenijim zemljama brojni sintetički fungicidi su zabranjeni zbog njihove visoke toksičnosti, dugog perioda

degradacije, akumulacije u lancima ishrane i zbog neselektivnog delovanja, jer uništavaju i korisne i štetne organizme (Strange, 1993). Zbog navedenih osobina, ispitivanje antifungalnog dejstva ekstrakata i etarskih ulja od velike je važnosti za suzbijanje uzročnika bolesti biljaka, gljiva i čoveka.

Smatra se da bi najefikasniji postupak u kontrolisanju rasta tzv. "skladišnih gljiva" bio primena smese različitih flavonoida, flavona i flavanona i komponenti etarskih ulja kao što su eugenol, karvakrol ili timol (Weidenborner i Jha, 1997). Nesupstituisani flavon i flavanon su izazvali inhibiciju rasta micelije vrsta roda *Aspergillus*, dok flavonol kvercetin nije pokazao inhibitornu aktivnost. Katehin se pokazao kao stimulator rasta *A. chevalieri*. Stoga se može zaključiti da su nesupstituisani flavoni i flavanoni visoko aktivni, dok su hidroksilovani flavonoidi posedovali slabu inhibitornu aktivnost (Weidenborner i sar., 1990). Izoflavanoni su imali najveću antifungalnu aktivnost na gljivu *Cladosporium herbarum*. Neredukovane strukture izoflavona imale su manje inhibitorno dejstvo na rast testiranih gljiva, budući da su kompletno redukovani izoflavoni, kao što su izoflavani, pokazali vrlo slabu aktivnost (Weidenborner i Jha, 1994).

## 1.7. Antioksidativna aktivnost

Pokazano je da slobodni radikali igraju dvostruku ulogu u našem telu. U niskoj/umerenoj koncentraciji slobodni radikali su uključeni u normalne fiziološke procese, ali povećana produkcija slobodnih radikala ili smanjenje antioksidativnog nivoa dovodi do oksidativnog stresa. To je proces koji može posredovati oštećenju ćelijskih struktura, uključujući lipide, proteine, RNK i DNK što dovodi do mnogih bolesti. Različiti sintetički lekovi koji se koriste u lečenju nekih bolesti takođe su u stanju da generišu slobodne radikale u telu i na taj način dovedu do mnogih oboljenja. Biljke su bogate antioksidansima, fito-sastojci koji imaju sposobnost da prekinu reakciju slobodnih radikala i zaštite naše telo od oksidativnog oštećenja. Različiti fitokonstituenti i biljni proizvodi koji su bezbedniji od sintetičkih lekova, takođe štite telo od slobodnih radikala da ne izazovu oštećenje tkiva. Fitokonstituenti imaju manje nuspojava i kompatibilni su sa fiziologijom tela, zato je zahtev savremenog doba da se koriste fitosupstance ili lekovi na bazi bilja (Sen i sar., 2010).

Kiseonik je element neophodan za život. Evolucija živih sistema je tekla u pravcu preživljavanja u prisustvu molekula kiseonika. Oksidativne osobine kiseonika igraju važnu ulogu u različitim biološkim fenomenima. Kiseonik kao i njegovi oksidi su od suštinskog značaja za život, a takođe mogu naneti velike štete unutar ćelije (Shinde i sar., 2006).

Slobodni radikali kao i negativne posledice koje nastaju njihovim delovanjem otkriveni su u protekloj deceniji. To su štetne materije proizvedene u telu zajedno sa toksinima i drugim štetnim materijama koji se formiraju tokom normalnog metaboličkog procesa u telu. Telo dobija energiju oksidacijom ugljenih hidrata, masti i proteina kroz aerobne i anaerobne procese i pri tome dolazi do formiranja velikog broja slobodnih radikala. Hiperprodukcija slobodnih radikala može biti odgovorna za oštećenje tkiva. Ćelijske membrane su izgrađene od nezasićenih lipida i upravo iz tog razloga su baš one posebno osetljivi na slobodne radikale. Oni mogu direktno da nanesu štetu lipidima koji čine sastavni deo ćelijskog zida. Raskidanje ili stvrdnjavanje lipida usled lipidne peroksidacije dovodi do smrti ćelije ili za ćeliju postaje neizvodljivo da pravilno dobije svoje hranljive materije. Pored lipida i drugi biološki molekuli uključujući enzime, DNK, RNK su takođe podložni oksidativnom oštećenju. Različiti



uslovi životne sredine podstiču formiranje slobodnih radikala što može dovesti do komplikacija u organizmu. Toksičnost olova, pesticida, kadmijuma, jonizujuće zračenje, alkohol, dim cigareta, UV zračenje i zagađenja, sve ovo može doprineti iniciranju i stvaranju slobodnih radikala (Langseth, 1996; Davies, 1991; Halliwell i Aruoma, 1993).

Antioksidansi su supstance koje imaju sposobnost da uklanjaju slobodne radikale i spreče ih da izazovu oštećenje ćelija. Slobodni radikali su odgovorni za izazivanje većeg broja zdravstvenih problema koji uključuju rak, starenje, bolesti srca, problemi gastrointestinalnog trakta itd. Antioksidansi daju zaštitni efekat neutrališući slobodne radikale, koji su toksični nusprodukti prirodnog ćelijskog metabolizma. Ljudsko telo prirodno proizvodi antioksidanse, ali proces nije 100% efikasan u slučaju prevelike proizvodnje slobodnih radikala, a efikasnost takođe opada i sa godinama (Sies, 1991; Goldfarb, 1993).

Povećani unos antioksidanasa može da spreči nastajanje bolesti. Istraživanje sve više pokazuje da hrana bogata antioksidansima, kao i upotreba lekovitog bilja, mogu biti jako korisni za zdravlje. Hrana eventualno povećava nivo antioksidanasa, jer namirnice sadrže puno antioksidativnih supstanci. Voće i povrće su poznati po ključnim antioksidansima kao što su vitamini A, C, E,  $\beta$ -karoten i važni minerali, uključujući selen i cink. Voće, povrće i lekovito bilje su najbogatiji izvori antioksidativnih supstanci (Sies i sar., 1992). Fitosupstance su takođe važan izvor antioksidanasa, jer mogu prekinuti lančane reakcije slobodnih radikala (Cody i sar., 1986; Oluwaseun i Ganiyu, 2008).

### **1.7.1. Slobodni radikali, reaktivni kiseonik i azotne vrste**

Slobodni radikali se mogu definisati kao molekuli ili molekulski fragmenti koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj poslednjoj atomskoj ili molekulskoj orbitali i mogu da postoje kao samostalni (Halliwell i Gutteridge, 1999). Reaktivne vrste kiseonika (ROS) i reaktivne vrste azota (RNS) opisuju slobodne radikale i druge neradikalske reaktivne derivate. Reaktivnost radikala je generalno veća nego kod neradikalskih vrsta, bez obzira na to što su radikali manje stabilni (Pham-Huy i sar., 2008). Slobodni radikali su formirani od molekula homolitičkim raskidanjem hemijske veze i

putem redoks reakcije. Jednom formirani ovi visoko reaktivni radikali mogu početi lančanu reakciju (Bahorun i sar, 2006; Valko i sar., 2006).

ROS i RNS uključuju radikale kao što su superoksid ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ), peroksil ( $RO_2^{\bullet}$ ), hidroperoksil ( $HO_2^{\bullet}$ ), alkoksil ( $RO^{\bullet}$ ), peroksil ( $ROO^{\bullet}$ ), azot-oksid ( $NO^{\bullet}$ ), azot-dioksid ( $NO_2^{\bullet}$ ) i lipid-peroksil ( $LOO^{\bullet}$ ) i ne-radikale kao što su vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ), hipohlorna kiselina ( $HOCl$ ), ozon ( $O_3$ ), singlet kiseonika ( $^1\Delta g$ ), peroksinitrat ( $ONOO^-$ ), azotna kiselina ( $HNO_2$ ), dinitrogen-trioksid ( $N_2O_3$ ), lipidni peroksidi ( $LOOH$ ) (Pham-Huy i sar., 2008). Ne-radikali se takođe označavaju kao oksidansi i sposobni su da lako vode reakcije slobodnih radikala u živim organizmima. Radikali izvedeni od kiseonika su okarakterisani kao najvažnija klasa slobodnih radikala generisanih u živim sistemima (Valko i sar., 2006; Miller i sar., 1990).

Na visokim koncentracijama, ROS može biti važan posrednik oštećenja ćelijskih struktura, nukleinskih kiselina, lipida i proteina (Valko i sar, 2007).  $O_2^{\bullet-}$  radikal je odgovoran za peroksidaciju lipida i takođe ima sposobnost da smanji aktivnosti drugih antioksidativnih sistema odbrane enzima kao što su katalaze (CAT). Glutation peroksid (GPx) dovodi do oštećenja ribonukleotida koji je neophodan za sintezu DNK. Protonski oblik  $O_2^{\bullet-}$  je  $HO_2^{\bullet}$ , koji je reaktivniji, može da prođe kroz membranu i izazove oštećenja tkiva.  $OH^{\bullet}$  radikal je najreaktivniji. To je snažan citotoksični agens sposoban da napada i ošteti skoro svaki molekul koji nađe u živom tkivu.  $H_2O_2$  nije u obliku radikala, ali dovodi do toksičnosti u ćeliji izazivajući oštećenje DNK, raskidanje membrane i oslobađanje jona kalcijuma u ćeliji, čime se aktivira kalcijum zavisini proteolitički enzimi (Halliwell i Gutteridge, 1999). Metali mogu da izazovu ROS napade na DNK i druge ćelijske komponente koje uključuju polinezasićene masne kiselinske ostatake fosfolipida, koji su izuzetno osetljivi na oksidaciju (Siems i sar., 1995). Peroksil radikali prouzrokuju štetu posle preuređenja preko reakcije ciklizacije na endoperokside. Studije pokazuju da slobodni radikali vrše oksidaciju svih aminokiselinskih ostataka proteina, posebno cisteina i metionina (Valko i sar., 2007; Stadtman, 2004).

### **Reakcija slobodnih radikala**

Slobodni radikali su obično uključeni u lančane reakcije, serije reakcija vode do ponovnog stvaranja radikala čime započinje novi ciklus reakcija. Slobodno-radikalske reakcije se odvijaju u tri različita koraka (Manavalan i Ramasamy, 2001):

- 1) Početni korak: formiranje radikala;
- 2) Propagacioni korak: lančane reakcije i formiranje novih radikala, što dovodi reakciju do kraja;
- 3) Terminacioni korak: uništavanje radikala.

### **Proizvodnja i izvori slobodnih radikala**

Slobodni radikali mogu se formirati od endogenih i egzogenih supstanci. Oni se neprekidno formiraju u ćelijama i okolnoj sredini. Različiti izvori slobodnih radikala su sledeći (Valko i sar., 2006; Nagendrappa, 2005; Ali i sar., 1996; Cadenas, 1989; Bagchi i Puri, 1998):

- UV-zračenje, X-zraci, gama zraci i mikrotalasna zračenja;
- Metal katalizovane reakcije;
- Kiseonikovi slobodni radikali u atmosferi se posmatraju kao zagađivači;
- Upala inicira neutrofile i makrofage da proizvode ROS i RNS;
- Stimulacija neutrofila izlaganjem mikroba;
- U mitohondrijalnim-katalizovanim reakcijama transporta elektrona, kiseonik-slobodni radikal nastaje kao produkt te reakcije;
- ROS formiran iz nekoliko izvora kao što su mitohondrijalne citohrom oksidaze, ksantin oksidaze, neutrofile i lipidne peroksidacije;
- ROS generisan metabolizmom arahidonske kiseline, trombocita, makrofaga i glatkih mišićnih ćelija;
- Interakcija sa hemikalijama, isparenja automobila, cigarete; sagorevanje organskih materija tokom kuvanja, šumski požari, vulkanske aktivnosti;
- Industrijske otpadne vode, višak hemikalija, unošenje alkohola, određeni lekovi, azbest, određeni pesticidi i herbicidi, neki joni metala, toksini gljiva i ksenobiotici.

### **1.7.2. Antioksidansi**

Antioksidansi su supstance koje usporavaju ili inhibiraju oksidativna oštećenja ciljnih molekula. U isto vreme jedan molekul sa antioksidativnom aktivnošću može da reaguje sa jednim slobodnim radikalom, neutrališe slobodne radikale dajući jedan svoj

elektron, završavajući reakciju. Antioksidansi sprečavaju oštećenje ćelija i tkiva, jer se ponašaju kao sakupljači slobodnih radikala. Ćelija stvara odbranu od prekomernih slobodnih radikala svojim preventivnim mehanizmima, reparacionim mehanizmima, fizičkom odbranom i antioksidativnom odbranom (Jacob, 1995).

Različite komponente deluju protiv slobodnih radikala kako bi ih neutralisali od radikala endogenog i egzogenog porekla (Jacob, 1995). One uključuju:

- Endogene enzimske antioksidanse;
- Ne-enzimske, metaboličke i hranljive materije antioksidanasa;
- Metal vezujuće proteine poput feritina, laktoferina, albumina i ceruloplazmina;
- Fitosupstance i fitonutritijente.

Telo proizvodi različite antioksidanse (endogeni antioksidansi) da neutrališu slobodne radikale i zaštiti organizam od raznih bolesti koje su rezultat oštećenja tkiva. Egzogeni antioksidansi su eksterno unose preko hrane što takođe igra važnu ulogu u zaštiti organizma. Organizam je razvio nekoliko endogenih antioksidativnih odbrambenih sistema svrstanih u dve grupe: enzimske i ne-enzimske. Enzimski sistem odbrane uključuje različite endogene enzime kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx), glutation reduktaze (GR), a ne-enzimski sistem odbrane uključuju vitamin E, vitamin C i redukovani glutation (GSH) (Jacob, 1995; Harris, 1992).

SOD je važni endogeni antioksidativni enzim koji deluje kao prva linija sistema odbrane od ROS-a, hvata i sakuplja superoksid radikale kao što je  $H_2O_2$ . GPx je prisutan u citoplazmi ćelija, odstranjuje  $H_2O_2$  kuplovanjem na  $H_2O$  sa oksidacijom GSH-a. GR je flavoprotein enzim i regeneriše GSH od oksidovanog glutationa u prisustvu NADPH. GSH je tripeptid i moćan antioksidans prisutan u citosolu ćelija i glavno je intracelularno neproteinsko tiol jedinjenje (NPSH). SH grupe prisutne u GSH reaguju sa  $H_2O_2$  i  $OH^\bullet$  radikalom i sprečavaju oštećenje tkiva, a GSH je takođe u stanju da uklanja ROS direktno ili enzimski preko GPx. Vitamini C i E su ne-enzimski endogeni antioksidansi, ali postoje i unutar normalne ćelije i reaguju sa slobodnim radikalima kako bi formirali sopstvene radikale koji su manje reaktivni od radikala koji nanose štetu. Oni raskidaju radikalske lančane reakcije uklanjajući peroksil i drugih reaktivnie radikale (Siems i sar., 1995; Ali i sar., 1996; Willcox i sar., 2004).

Neenzimski antioksidansi takođe se mogu podeliti na metaboličke antioksidanse i antioksidanse hranljivih materija. Metabolički antioksidansi su endogeni antioksidansi. Oni su proizvodi metabolizma u telu, a tu spadaju lipoidna kiselina, glutation, L-arginin, koenzim Q10, melatonin, mokraćna kiselina, bilirubin, metal-helatni protein, transferin itd. (Willcox i sar., 2004; Droge, 2002). Dok antioksidansi hranljivih materija koji pripadaju egzogenim antioksidansima, koji ne mogu biti proizvedeni u telu, ali se unose kroz ishranu mogu biti u vidu metala (selen, mangan, cink), flavonoidi, omega-3 i omega-6 masne kiseline itd. (Pham-Huy i sar., 2008). Vitamini E i C su ne-enzimski antioksidansi i postoje u normalnim ćelijama, ali se mogu uneti i preko hrane (Tiwari, 2001). Značajnu grupu prirodnih antioksidanasa čine biljni sekundarni metaboliti i to su: biljni fenoli (fenolne kiseline, flavoni, izoflavoni, flavan-3-oli, antocijani, proantocijanidini, tanini itd), terpenoidi, tokoferoli, glukozinolati, kao i jedinjenja koja sadrže sumpor, koji pored antioksidativnih poseduju i antimitotagena, antikancerogena, anti-inflamatorna, antiulkusna i antimikrobna svojstva, a takođe smanjuju rizik od pojave kardiovaskularnih oboljenja.

Antioksidansi mogu vršiti svoju aktivnost preko nekoliko mehanizama, tako što suzbijaju proizvodnju aktivnih vrsta smanjenjem hidroperoksida i  $H_2O_2$ , oduzimanjem jona metala, uklanjanjem završnih produkata lančanih reakcija aktivnih slobodnih radikala i vršenjem popravke i/ili uklanjanja oštećenih ćelija. Biosinteza drugih antioksidanasa ili odbrambenih enzima takođe je izazvana nekim antioksidansima (Tiwari, 2001; Tiwari, 2004). Zato se antioksidansi mogu sintetisati u telu ili se mogu uneti u vidu fitosupstanci koje igraju važnu ulogu u zaštiti tela od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima.

### **1.7.3. Oksidativni stres i zdravlje ljudi**

Slobodni radikali su od suštinskog značaja za bilo koji biohemijski proces i predstavljaju važni deo aerobnog načina života i našeg metabolizma. Oni se stalno proizvode u telu preko enzimskih i ne-enzimskih reakcija kao što su reakcije respiratornog lanca, fagocitoza, sinteza prostaglandina, citohrom P450 sistem i oksidativne fosforilacije (npr. aerobnog disanja) u mitohondrijama (Tiwari, 2004; Halliwell, 2007; Pacher i sar., 2007).

Oksidativni stres je štetno stanje koje nastaje kada postoji višak ROS i/ili je smanjen antioksidativni nivo. Do toga može doći usled fizičkih, hemijskih, psiholoških problema koji dovode do oštećenja tkiva kod ljudi i samim tim dovodi do pojave mnogih bolesti (Tian i sar., 2007). Živa bića su razvila jako složen sistem odbrane i telo deluje protiv oksidativnog stresa prouzrokovanog slobodnim radikalima uključujući različite odbrambene mehanizme kao što su: preventivni mehanizmi, reparacioni mehanizmi, fizička odbrana i antioksidativna odbrana (Valko i sar., 2007).

Reakcije izazvane od strane kiseonik-slobodnih radikala su odgovorne za patogenezu mnogih bolesti (Pham-Huy i sar., 2008; Valko i sar., 2007; Agarwal i Prabakaran, 2005; Pourmorad i sar., 2006; O'donovan i Fernandes, 2004; Dufor i sar., 2007; Gupta i sar., 1997; Kehrer i Smith, 1994; Sen i sar., 2009; Poli i sar., 2004; Valko i sar., 2004) uključujući:

- Neurodegenerativni poremećaji poput Alchajmerove bolesti, Parkinsonove bolesti, multipla skleroze, amiotrofična lateralna skleroza, gubitak memorije i depresija;
- Kardiovaskularne bolesti kao što su ateroskleroza, ishemijska bolest srca, srčana hipertrofija, hipertenzija, šok i trauma;
- Plućne bolesti kao što su upala pluća, bolesti kao što su astma i hronična opstruktivna bolest pluća;
- Bolesti povezane sa prevremenim rođenjem dece, uključujući displaziju, intraventrikularno krvarenje, retinopatiju preranog rođenja i nekrotični enterokolitis;
- Autoimune bolesti kao što je reumatoidni artritis;
- Poremećaji bubrega kao što su glomerulonefritis i tubulointersticijalni nefritis, hronične bubrežne insuficijencije, proteinurija, uremije;
- Gastrointestinalne bolesti kao što su peptički ulkus, inflamatorne bolesti creva i kolitis;
- Tumori i rak kao što su rak pluća, leukemije, rak dojke, jajnika, rak rektuma itd;
- Očne bolesti kao što su katarakta i bolesti vezane za retinu, makulopatija;
- Proces starenja;
- Dijabetes;

- Kožne lezije;
- Imunodepresija;
- Bolesti jetre, pankreasa;
- AIDS;
- Neplodnost.

### **Lekovite komponente iz biljaka kao antioksidansi**

Ljudsko telo u sebi sadrži prirodne antioksidanse i može da spreči pojavu mnogih bolesti, kao i da leči bolesti izazvane i/ili podstaknute posredovanjem slobodnih radikala. Ljudi takođe uzimaju antioksidanse kroz ishranu. U hrani, antioksidansi se nalaze u malim količinama, ali su sposobni da spreče ili znatno uspore oksidaciju (Tiwari, 2001).

Nedavna istraživanja su pokazala da antioksidansi biljnog porekla mogu imati veliki značaj kao terapijski agensi kod pojedinih bolesti izazvane usled oksidativnog stresa (Ramchoun i sar., 2009). U **Tabeli 1.7.3.** prikazane su biljne vrste iz familije Apiaceae koje poseduju antioksidativna svojstva. Biljni ekstrakti i fitokonstituenti su efikasani jer deluju tako što uklanjaju slobodnih radikala i inhibitoraju lipidnu peroksidaciju (Dash i sar., 2007; Yildirim i sar., 2001). Mnoga sintetička antioksidativna jedinjenja su pokazala toksična i/ili mutagena dejstva, što je podstaklo mnoge istraživače za pretragom prirodnih antioksidanasa (Nagulendran i sar., 2007). Lekovi biljnog porekla su i dalje oslonac za oko 75-80% svetske populacije, uglavnom u nerazvijenim zemljama, a koriste se i za primarnu zdravstvenu zaštitu. Hemijski sastojci prisutni u lekovima biljnog porekla ili u samim biljkama su deo fizioloških funkcija samih biljaka i zato se veruje da imaju bolju kompatibilnost sa ljudskim telom. Prirodni proizvodi od biljaka su bogati izvori antioksidanasa korišćeni vekovima da leče razne bolesti. Upotreba bioaktivnih jedinjenja biljnog porekla je u porastu, jer suština korišćenja sintetičkih droga je u tome da one pored svog primarnog delovanja imaju i sekundarni efekat koji može biti još opasniji nego bolesti za koje se tvrdi da leči. Nasuprot tome, lekovi biljnog porekla su zasnovani na pretpostavci da sadrže prirodne supstance koje mogu da promovišu zdravlje i ublaže bolesti, dokazano je i da su bezbedni, postoji bolja tolerancija pacijenta i relativno su jeftiniji (Sen i sar., 2009; Ramchoun i sar., 2009; Kamboj, 2000). Čak i sintetičke droge koje se koriste za lečenje

raznih poremećaja u stanju su da proizvedu slobodne radikale što dovodi do oksidativnog stresa i izaziva oštećenje tkiva. Na primer, ne-steroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) se koriste široko u lečenju bola, povišene temperature, zapaljenja, reumatskih i kardiovaskularnih bolesti, ali hronična primena tih lekova dovodi do stvaranja slobodnih radikala koji mogu da rezultuju pojavu oštećenja želuca ili duodenuma i teških komplikacija kao što su gastrointestinalno krvarenje i perforacije (Kamboj, 2000).

Upotreba fitokonstituenata u cilju terapije tj. uklanjanju slobodnih radikala kao i za lečenje poremećaja nastalih usled oksidativnog stresa, pokazao se klinički efikasan i relativno manje toksičan od postojećih lekova. Zato je potražnja lekova iz biljnih izvora ili fitokonstituenata vremenom postala sve veća.

**Tabela 1.7.3.** Pojedine biljne vrste iz familije Apiaceae koje poseduju antioksidativnu aktivnost.

Naziv vrste	Reaktivne komponente	Reference
<i>Angelica sylvestris</i> L. (seme, koren)	flavonoidi, kumarini	Sarker i sar., 2003
<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. (nadzemni deo, koren)	flavonoidi (apiin), lignani	Elmastaş i sar., 2006
<i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. (nadzemni deo)	flavonoidi (kvercetin, apigenin)	Milovanović i sar. 1996
<i>Carum carvi</i> L. (plod)	flavonoidi, etrarska ulja	Hinneburg i sar., 2006
<i>Daucus carota</i> L. (koren)	antocijani, karotenoidi, hlorogenska kiselina	Sun i sar., 2009
<i>Eryngium campestre</i> L. (nadzemni deo)	flavonoidi, triterpeni	Küpeli i sar., 2006
<i>Sanicula europaea</i> L.	derivati rozmarinske kiseline	Le Claire i sar., 2005



## 1.8. Biološka aktivnost

Na osnovu uvida u obimnu literaturu koja je korišćena u ovom radu utvrđeno je da za većinu ispitivanih vrsta, nije poznata antioksidativna i antimikrobna aktivnost. Iz tog razloga predstavljeni su podaci koji daju informacije o biološkoj aktivnosti pojedinih vrsta iz familije Apiaceae.

Trovanje hranom različitim patogenima predstavlja veliki problem kako za potrošače tako i za industriju za proizvodnju hrane, uprkos korišćenju različitih metoda za očuvanje. Usled pojave rezistentnosti koje su patogeni izgradili na mnoge antibiotike, sve je veće interesovanje za prirodnim antibakterijskim produktima kao što su npr. biljni ekstrakti i začini (Smid i Gorris, 1999). Prirodni ekstrakti pravljani od svežeg biljnog materijala i biološki aktivna jedinjenja izolovana iz različitih biljnih vrsta koje se već vekovima koriste u narodnoj medicini, mogu predstavljati dragocene izvore za proizvodnju novih prirodnih konzervanasa (Al-Fatimi i sar., 2007). Neke vrste, iz roda *Eryngium*, koriste se u narodnoj medicini. Mladi korenovi i izdanci vrste *E. maritimum* L. koriste se u ishrani kao povrće; dok se mladi listovi upotrebljavaju kao salata u severnoj Evropi i Grčkoj. Kandirani koren vrste *E. maritimum*, kao i vrste *E. campestre* L. koristi se u obliku tonika kao afrodisijak pogotovo u Engleskoj. Mladi listovi vrste *E. creticum* Lam. se koriste u ishrani kao povrće (de Guzman i Siemonsma, 1999) dok se vrsta *E. aquaticum* L. ponekad sreće kao gajena. Vrsta *E. foetidum* L. je bitna za Latinsku Ameriku jer se koristi u kuhinji kao začim, a sve veću primenu ima i u jugoistočnoj Aziji. Poznato je da se korenovi sledećih vrsta *E. maritimum*, *E. creticum* i *E. foetidum* koriste u narodnoj medicini (npr. kao diuretici i spazmolitici) (Ping i sar., 2012). Pojedine vrste ovog roda se gaje kao ukrasne kao npr. *E. caucasicum* (Khoshbakht i sar., 2007). Ekstrakti dobijeni iz korena i nadzemnog dela vrsta roda *Eryngium* (Apiaceae) koriste se u svetu kao narodni lek za lečenje mnogih inflamatornih bolesti. Etanolni i vodeni ekstrakti dobijeni iz nadzemnog dela i korena osam vrsta iz roda *Eryngium* (*E. campestre*, *E. creticum*, *E. davisii*, *E. falcatum*, *E. isauricum*, *E. kotschyi*, *E. maritimum* i *E. trisectum*) u Turskoj, ispitivani su *in vivo* i utvrđena je njihova anti-inflamatorna i antinociceptivna aktivnost. Na osnovu dobijenih rezultata, izuzev ekstrakta vrste *E. falcatum*, etanolni ekstrakti nadzemnog dela i korena ostalih ispitivanih vrsta pokazuje očiglednu anti-inflamatornu aktivnost (Küpeli i sar.,

2006). Hlorogenska i rozmarinska kiselina, fenolne komponente za koje je već poznato da imaju antioksidativnu aktivnost, opisane su kod mnogih vrsta iz roda *Eryngium*, kao i kod vrste *Sanicula europea* L. (Hiller, 1965; Hiller i Kothe, 1967). U potrazi za novim jedinjenjima koje pokazuju antioksidativnu aktivnost, ekstrakti divljih planinskih vrsta su pokazali svoju sposobnost da smanjuju radikale DPPH. Za vrstu *E. alpinum* L. utvrđeno je da ekstrakt korena pokazuje snažniju antioksidativnu aktivnost u odnosu na nadzemni deo iste biljke (le Claire i sar., 2005). Glavni saponini koji se sreću u okviru ovog roda poseduju anti-inflamatornu aktivnost (Matsuda i sar., 1997; Sirtori, 2001; Wei i sar., 2004), anti-HIV-1 proteaznu aktivnost (Yang i sar., 1999) i citotoksičnu aktivnost tumorskih ćelija (D'Acquarica i sar., 2002; Fu i sar., 2006; Chan, 2007; Zhang i Li, 2007).

Na osnovu ranijih istraživanja vrsta roda *Seseli*, utvrđeno je da ekstrakt vrste *S. pallasii* poseduje toksičan efekat i inhibira rast larvi vrste *Spodoptera littoralis* (Pavela, 2011). U istočnom delu Turske *S. libanotis* se često koristi kao konzervans i začim koji se dodaje sirevima i pri tome daje karakterističan miris. Takođe, *S. libanotis* i 25 različitih biljnih vrsta se koriste u pravljenju biljnih sireva (Ozturk i sar., 2000). Sveži listovi vrste *S. libanotis* se koriste kao povrće u ishrani u istočnom delu Turske (Baytop, 1999). Metanolni ekstrakt ove vrste ima širok spektar antimikrobne aktivnosti posebno na sledeće sojeve *Bacillus cereus*, *B. dipsauri*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Kocuria rosea*, *Neisseria subflava* i *Micrococcus lylae*. Inhibitorni efekat je jako bitan jer se automatski ova vrsta može koristiti kao prirodni konzervans u hrani (Ozturk i Ercisli, 2006). Etarsko ulje vrste *S. annuum*, koja raste u Srbiji, u najvećoj meri sadrži sledeće komponente: germakren-D, sabinen,  $\beta$ -ocimen i limonen. Ovo ulje pokazuje antifungalnu aktivnost na petnaest vrsta gljiva gde je utvrđen MIC od 12.5 do 50  $\mu$ l/ml (Milosavljević i sar., 2007). Takođe, etarsko ulje iz nadzemnog dela vrste *S. globiferum* Vis. sa glavnim komponentama sabinenom,  $\alpha$ -pinenom i  $\beta$ -felandrenom pokazuje aktivnost na sledeće bakterijske sojeve: *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus flavus*, *Lysteria monocytogenes* i *Escherichia coli*, kao i na sve ispitivane mikromicete (Janačković i sar., 2011). Etarsko ulje izolovano iz vrste *S. montanum* ssp. *tommasinii* je takođe pokazalo srednje jaku antimikrobnu aktivnost, što se može objasniti prisustvom sledećih hemijskih komponenti:  $\beta$ -pinen, germakren-D, sabinen,  $\alpha$ -pinen i limonen

(Siljegović i sar., 2011). Etarsko ulje vrste *S. rigidum* sadrži  $\alpha$ -pinen, kamfen,  $\beta$ -pinen i limonen. Za ove komponente je poznato da imaju antimikrobnu aktivnost i da su potencijalni antioksidansi (Stojković i sar., 2007).

Analizirajući rod *Peucedanum* uočeno je da vrste ovog roda poseduju biološki aktivne materije kao što su furokumarini i piranokumarini. Neka od ovih jedinjenja poseduju antimikrobnu i citotoksičnu aktivnost (Schillaci i sar., 2003). Pojedine komponente (npr. peucedanin i 8-metoksipeucedanin, pripadaju furanokumarinima, poseduju karakterističnu strukturu i javljaju se samo kod vrste *P. officinale* i kod njenih srodnih vrsta kao što su *P. coriaceum* i *P. longifolium*) mogu biti važne posmatrajući ih sa hemotaksonomskog aspekta. Peucedanin je veoma efektan pri izazivanju apoptoze i inhibiciji heat-shock proteina koji se javljaju u HeLa ćelijama (Bartnic, 2007). Acetonski ekstrakt vrste *P. nebrodense* pokazuje antimikrobnu aktivnost na sledeće sojeve *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* i *Streptococcus agalactia* (Schillaci i sar., 2003). Vrsta *P. ostruthin* sadrži ostrutin (6-geranil-7-hidroksi kumarin), imperatorin i umbeliferon, od kojih ostrutin pokazuje snažnu aktivnost na pojedine vrste mikobakterija (MICs 3.4 - 107.4  $\mu$ M) dok umbeliferon pokazuje slabu aktivnost (MIC= 0.79 mM) (Schinkovitz i sar., 2003). Plod metanolnog ekstrakta vrste *P. graveolens* ima umereni efekat na *Salmonella thyphi* pri čemu je zona inhibicije  $\leq 5-9$  mm (Phulan i Neeraj, 2004).

U ranijim istraživanjima, utvrđeno je da su glavne komponente etarskog ulja vrste *Pastinaca sativa* terpinolen (40-70%) i miristicin (17-40%). Kod vrste *Pastinaca sativa* subsp. *urens*, u etarskom ulju semena identifikovano je 18 komponenti od kojih su najzastupljenije bile oktil-butirat (79.5%) i oktil-heksanoat (5.3%) (Kurkcuoğlu i sar., 2006). Utvrđeno je da se u ekstraktima semena vrste *Pastinaca sativa* nalaze furanokumarini tipa bergapten, imperatorin, felopterin, ksantotoksin i izopimpinelin (Waksmundzka-Hajnos i sar., 2004).

Prethodne studije vrsta roda *Tordylium* pokazale su da pojedine komponente koje sadrže ove vrste poseduju biološki aktivne materije. Začinska vrsta *T. apulum* iz Grčke, sadrži flavonoide i seriju antifungalnih i citotoksičnih kumarina (Kofinas i sar., 1998; Kofinas i sar., 1998). Pokazana je i antibakterijska aktivnost etarskog ulja nadzemnog dela vrste *T. apulum*, gde su dominantne komponente bile  $\alpha$ -humulen (28.7%), oktil-heksanoat (11.7%) i farnezil-aceton (9.8%) (Kofinas i sar., 1993). Pogotovo listovi vrste

*T. apulum* pokazuju značajnu aktivnost u okviru lipid peroksidacionog testa (Pieroni i sar., 2002). Trillini i sar. (2006) su takođe ispitivali sastav etarskog ulja vrste *T. apulum* iz Italije i utvrdili da su glavne komponente (E)- $\beta$ -ocimen (17.3%),  $\alpha$ -humulen (11.4%) i oktil-oktanoat (8.8%). Etarska ulja nadzemnog dela pojedinih vrsta roda *Tordylium* koje rastu u Turskoj, sadrže kao glavne komponente sladeće jedinjenja:  $\beta$ -kariofilen (19.5%), kariofilen-oksidi (18.3%),  $\alpha$ -bisabolen (13.1%) za vrstu *T. trachycarpum*; 2-tridekanon (11.3%), kariofilen-oksidi (10.0%) za etarsko ulje vrste *T. lanatum*;  $\alpha$ -bisabolen (20.6%),  $\beta$ -kariofilen (8.1%), kariofilen-oksidi (6.8%) etarsko ulje vrste *T. aegyptiacum*;  $\alpha$ -bisabolen (13.5%), kalamenen (9.1%),  $\alpha$ -humulen (5.7%) u etarskom ulju *T. syriacum*; oktil 2-metilbutirat (19.7%), oktil-heksanoat (16.6%), 1-oktanol (8.8%) u etarskom ulju vrste *T. pustulosum* (Tosun, 2011).

Biološka aktivnost vrsta u okviru roda *Cachrys* nije ispitivana, ali se za pojedine vrste zna sastav etarskog ulja. Etarsko ulje ploda *C. cristata* iz Turske sadrži heksadekansku kiselinu (11.6%), nonakozan (8.0%), germakren D (6.1%) i miristicin (4.4%) (Özek i sar., 2007). Jedinjenja kao što su heksadekanska kiselina i miristicin nisu pronađeni u sastavu etarskog ulja ploda iste vrste samo iz Srbije. Özer i sar. (2007) ispitivali su sastav etarskog ulja nadzemnog dela srodne vrste *Hippomarathrum microcarpum* (Bieb.) Fedtsch. iz Turske i utvrdili da sadrži bornil-acetat (19.9%), kariofilen-oksidi (7.7%),  $\beta$ -kariofilen (6.3%) i pinokarvon kao glavne konstituentne. Autori iz Irana objavili su sastav etarskog ulja listova i cvasti za vrstu *H. microcarpum* i utvrdili su da su glavne komponente  $\beta$ -kariofilen (26.4% i 18.5%) i  $\gamma$ -murolen (19.0% i 19.2%) (Sefidkon i Shaabani, 2003). Autori iz Španije dali su hemijski sastav etarskog ulja ploda vrste *Cachrys trifida* koje sadrži  $\gamma$ -terpinen (28.3-37.3%), limonen (14.2-34.5%), *p*-cimen (14.1-24.5%),  $\alpha$ -pinen (3.8-11.3%) i (E)- $\beta$ -ocimen (3.0-8.0%), dok ulje iz stabla i listova sadrži u najvećem procentu (E)- $\beta$ -ocimen (61.0-70.7%), (Z)- $\beta$ -ocimen (20.4-51.5%) i  $\gamma$ -terpinen (3.8-8.5%) (Palá-Paúl i sar., 2004). Etarsko ulje Mediteranske vrste *C. ferulacea*, sadrži kao glavne komponente  $\alpha$ -pinen (18.2%), sabinen (15.9%) i limonen (15.1%) (Palá-Paúl i sar., 2004; Baser i sar., 1996). Etarsko ulje nadzemnog dela *C. sicula* iz Španije, sadrži *p*-cimen (17.8-36.7%), mircen (6.1-18.8%), sabinen (4.4-18.5%) i  $\alpha$ -pinen (8.1-16.3%), dok su  $\alpha$ -pinen (19.1-21.8%),  $\gamma$ -terpinen (1.8-21.6%) i mircen (15.0-18.8%) karakteristični za etarsko ulje ploda (Palá-Paúl i sar., 2002). Vrsta koja je jako bliska vrsti *C. sicula* (razlika postoji samo u brakteji na involukrumu),

*C. libanotis* sakupljena u Alžiru, sadrži etarsko ulje koje je bogato germakrenom D (18.0%) (Bouderdara i sar., 2011). Etarsko ulje vrste *Hippomarathrum boissieri* iz Turske kao glavne komponente sadrži  $\beta$ -kariofilen (25.5%), kariofilen-oksid (9.4%) i  $\alpha$ -pinen (8.8%) (Baser sar., 2000). Etarsko ulje poloda vrste *Cachrys alpina* sadrži  $\alpha$ -humulen (33.1%), *p*-cimen (9.3%),  $\alpha$ -felandren (9.1%), gemakren D (8.2%) i  $\alpha$ -pinen (6.3%) kao glavne komponente (Baser sar., 2004).

U okviru roda *Opopanax* utvrđeno je da se vrsta *O. chironium* koristi kao ekspektorans i antispazmodik (Maruzzella, 1959). U Turskoj narodnoj medicini stablo vrste *O. hispidus* se koristi za lečenje neplodnosti kod žena (Özgen i sar., 2012).

## 2. CILJ RADA

Poznato je da se biljke iz familije Apiaceae, zbog svojih aromatičnih svojstava, vekovima koriste kako u ishrani kao začini tako i u lekovite svrhe. Razlog tome je prisustvo velikog broja biološki aktivnih jedinjenja. Pretpostavlja se da upravo te aktivne supstance mogu delovati negativno na rast i razmnožavanje većeg broja bakterija i gljiva, kao i da mogu poslužiti kao dobri antioksidansi uklanjanjem slobodnih radikala. Postoji sve veća potreba za fitopreparatima koji će se koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji i medicini.

Osnovni ciljevi rada se mogu predstaviti u nekoliko teza:

- Kvalitativna i kvantitativna analiza hemijskog sastava etarskih ulja odabranih vrsta biljaka korišćenjem GC i GC-MS tehnika;
- Ispitivanje antimikrobnog (antibakterijskog i antifungalnog) dejstva etarskih ulja i ekstrakata korišćenjem metode mikrodilucije na mikrotitracionim pločama;
- Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata;
- Poređenje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata odabranih vrsta biljaka sa dejstvom komercijalnih lekova;
- Izbor biljaka, odnosno etarskih ulja i ekstrakata sa najjačim dejstvom *in vitro* kao potencijalne osnove za dalja aplikativna istraživanja;
- Određivanje ukupne količine polifenola u ekstraktima reakcijom po Folin-Ciocalteu;
- Određivanje ukupne količine flavonoida u ekstraktima.
- Utvrđivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata DPPH metodom i metodom ABTS testa i poređenje dobijenih rezultata sa poznatim antioksidansima BHA i Vitaminom C.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1. Biljni materijal

Biljni materijal korišćen u ovom radu je ubran i determinisan od strane prof. dr Vladimira Ranđelovića i prof. dr Petra Marina. Vaučeri se nalaze u Herbarijumu Instituta za botaniku i botaničkoj bašti "Jevremovac" (BEOU) (Tabela 3.1.)

Tabela 3.1. Spisak analiziranih biljnih vrsta.

Vrsta	Poreklo i vreme sakupljanja	Vaučerski broj
<i>Eryngium serbicum</i> Pančić	Kosovska Mitrovica, 2003	ES 6039
<i>Seseli pallasii</i> Besser	Soko Banja (Soko Grad), 2003	–
<i>Seseli libanotis</i> (L.) Koch subsp. <i>intermedium</i> (Rupr.) P. W. Ball	Stara planina (Babin Zub), 2009	SL 16433
<i>Seseli libanotis</i> (L.) Koch subsp. <i>libanotis</i>	Kopaonik, 2003	LM 60313
<i>Peucedanum officinale</i> L.	Kosovska Mitrovica, 2003	PO 60322
<i>Peucedanum longifolium</i> W. et K.	Orjen, 2003	PL 60319
<i>Peucedanum aegopodioides</i> (Boiss.) Vand.	Kopaonik, 2003	PA 60320
<i>Peucedanum alsaticum</i> L.	Fruška gora, 2003	PA 60318
<i>Pastinaca sativa</i> L.	Kopaonik, 2003	PSa 60316
<i>Heracleum sphondylium</i> L.	Kopaonik, 2003	–
<i>Tordylium maximum</i> L.	Ozren (Soko Banja), 2003	BEOU TM 60324
<i>Cachrys cristata</i> DC.	Rujan planina, 2010	BEOU 16434
<i>Opopanax hispidus</i> (Friv.) Griseb.	Rujan planina, 2010	BEOU 16435

### 3.1.2. Izolovanje etarskog ulja

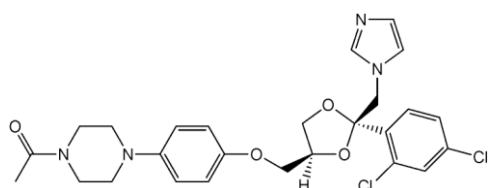
Za dobijenje etarskih ulja korišćena je metoda destilacije pomoću vodene pare po Klevendžeru (Europ. Ph., 2004). Odmeren, osušen i usitnjen biljni materijal stavljen je u balon za destilaciju i preliven destilovanom vodom. Proces destilacije ulja trajao je 3 h, nakon čega je izvršeno eluiranje. Viskozna ulja su u levku za odvajanje odvojana od vodene faze pomoću etra. Ostatak vode je uklonjen pomoću anhidrovanog  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Uparavanje etra izvršeno je pomoću vakuum uparivača. Izračunata je masa čistog ulja i njegov udeo u odnosu na ukupnu količinu materijala.

### 3.1.3. Dobijanje ekstrakata

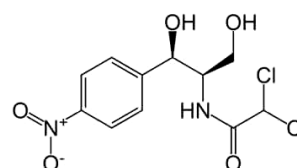
Osušeni i usitnjen biljni materijal (10 g) ekstrahuje se pomoću različitih organskih rastvarača i to metanola, etil-acetata i acetona (100 ml). Ekstrakcija se odvija u toku 24 h na tamnom mestu. Ekstrakcija u prvom i poslednjem satu predviđenog vremena je u ultrazvučnom kupatilu. Posle filtriranja i ispiranja odgovarajućim rastvaračima vrši se uparavanje ekstrakta do suva pomoću vakuum uparivača. Ekstrakti se pakuju u bočice i čuvaju na hladnom i tamnom mestu. Za dobijanje vodenog ekstrakta, biljni materijal se ekstrahuje pomoću vode, zamrzava i liofilizira u aparatu za liofilizaciju. Dobijeni liofilizati su u vidu suvih, praškastih ekstrakata koji se čuvaju na suvom i tamnom mestu.

### 3.1.4. Hemikalije i reagensi

U radu su korišćeni **antimikotici**: *nistatin*- $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{NO}_{17}$  i *ketokonazol*- $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$ , (Slika 3.1.4) i **antibiotici**: *streptomycin*- $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_{12}$ , *hloramfenikol*- $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$  (Slika 3.1.5) i *ampicilin*- $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ .



Slika 3.1.4. Formula ketokonazola



Slika 3.1.5. Formula hloramfenikola



Svi organski rastvarači su „Zorka pharma“ Šabac, Srbija. Galna kiselina, BHA (3-tert-butil-4-hidroksianizol) i DPPH (2,2-difenil,1-pikril hidrazil) su nabavljeni od Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA). Folin-Ciocalteu fenolni reagens je iz Merck-a (Darmstadt, Nemačka). Anhidrovani natrijum-karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), kalijum-acetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$ ), kalijum-peroksidisulfat ( $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ) i L(+)- askorbinska kiselina (vitamin C) su naručeni od AnalaR Normapur (VWR, Geldenaaksebaan, Leuven Belgija). Aluminijum nitratnonahidrat ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) je dobavljen od Fluka Hemija AG (Buchs, Švajcarska). ABTS i kvercetin hidrat su iz TCI Europe NV (Boerenveldsweg, Belgija). Anhidrovani natrijum-sulfat je dobavljen od PRO Analysis (Alkaloid, Skoplje). Svi rastvarači i supstance su p.a. čistoće.

### 3.1.5. Testirane bakterije

Za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti korišćene su bakterije iz laboratorije, Instituta za Biološka istraživanja “Siniša Stanković” u Beogradu. Testirane su sledeće vrste bakterija: Gram-negativne: *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Enterobacter cloacae* (ljudski izolati) i Gram-pozitivne bakterije: *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Bacillus cereus* (ljudski izolati), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Za ispitivanje *in vitro* antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata pomenutih biljnih vrsta korišćeni su sledeći tipski laboratorijski sojevi mikroorganizama koji se nalaze u mikrobiološkoj laboratoriji na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Nišu: Gram-negativne: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) i Gram-pozitivne bakterije: *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (ATCC15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

### 3.1.6. Testirane mikromicete

U radu su korišćene gljive iz mikoteke Mikološke laboratorije, Instituta za Biološka istraživanja “Siniša Stanković” u Beogradu. Testirane su sledeće vrste

mikromiceta: *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *A. ochraceus* (ATCC 12066), *A. versicolor* (ATCC 11730), *A. fumigatus* (ATCC 9142), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *P. ochrochloron* (ATCC 9112), *Trichoderma viride* (IAM 5061) i *Candida albicans* (ATCC 10231), koja je korišćena i u laboratoriji Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu za testiranje etarskih ulja i ekstrakata pomenutih vrsta. Mikromicete su gajene na malt-agar (MA) podlozi i presejavane su svakog meseca. Kulture se čuvaju na 4°C.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Metode za analizu etarskih ulja

Kvantitativna i kvalitativna analiza dobijenih etarskih ulja izvršena je kombinacijom metoda gasne hromatografije (GC) i gasne hromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MC).

#### 3.2.1.1. GC i GC-MS

Kvalitativna i kvantitativna analiza etarskog ulja vršena je korišćenjem plameno-jonizujućeg (FID) i maseno-spektrometrijskog detektora (MSD). GS analiza je urađena na gasnohromatografskom aparatu HP-5890 series II koji je opremljen split-splitless injektorom, HP-5-srednje polarnom kolonom (25 m x 0.32 mm) i povezan sa plameno-jonizujućim detektorom (FID). Protok nosećeg gasa (H<sub>2</sub>) je 1ml/min. Rastvor etarskog ulja u etanolu injektovan je u split modu (1:30), temperatura injektora je bila 250 °C, detektora 300°C, dok je temperatura kolone povećavana programirano od 40-280°C, po 4°C/min. Za GC-MSD, korišćen je HP G1800 C serije, II GCD opremljen sa HP-5MS kolonom (30 m x 0.25 mm). Transfer linija je zagrejana na 280°C. EIMS spektri su snimani na 70 eV u opsegu *m/z* 40-300. Identifikacija jedinjenja izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena sa retencionim vremenom referentnih terpenoida, metodom koinjektiranja, poređenjem masenih spektara (za šta je korišćena biblioteka masenih spektara (Wiley 275. L)) i na osnovu retencionih indeksa dobijenih korišćenjem kalibrisanog AMDIS programa i njihovo poređenje sa onima iz literature (Adams, 2007). Kvantifikacija je izvršena metodom normalizacije površina ispod GC pikova.

### **3.2.2. Metode za analizu ekstrakata**

Određivanje antioksidativne aktivnosti (DPPH i ABTS-test), kao i određivanje ukupnih flavonoida korišćena je UV spektrofotometrija. Za dobijanje ukupnih polifenola korišćena je spektrofotometrijska metoda po Folin-Ciocalteu.

### **3.2.3. Metode za određivanje polifenola**

#### **3.2.3.1. Određivanje ukupnih fenola kolorimetrijski reakcijom po Folin-Ciocalteu**

Koncentrisani komercijalno pripremljen Folin-Kikoltov reagens razblažen je destilovanom vodom u odnosu 1:10 (Singleton i sar., 1999). U 300  $\mu$ l razblaženog uzorka dodato je 1500  $\mu$ l FC reagensa, nakon 6 min držanja u mraku dodat je 7.5% rastvora  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Sadržaj je izmešan na vorteksu, a epruvete su pokrivene i ostavljene 2 h na tamnom mestu. Osnovni standard galne kiseline dobijen je rastvaranjem 5.52 mg kristalne monohidratne galne kiseline (Mr 188,14 g/mol) u destilovanoj vodi do 50 ml. Koncentracije 100, 50, 25 i 10 mg/ml su korišćeni za konstrukciju kalibracione krive. Za kalibracionu krivu mereno je 300  $\mu$ l standardnog rastvora galne kiseline, dodat FC-reagens i rastvor  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Slepa proba, umesto 300  $\mu$ l uzorka, sadrži 300  $\mu$ l destilovane vode.

Na spektrofotometru su merene apsorbanca na talasnoj dužini 740 nm prema blanku. Apsorbanca slepe probe je prethodno merena prema destilovanoj vodi.

Koncentracija ukupnih polifenola u originalnim uzorcima u ppm (mg/l) ekvivalentima galne kiseline GAE su izračunate tako što su koncentracije dobijene na osnovu kalibracione krive pomnožene sa faktorom razblaženja (Džamić, 2010).

#### **3.2.3.2. Određivanje ukupnih flavonoida kolorimetrijski**

U 600  $\mu$ l razblaženog uzorka dodato je 2580  $\mu$ l smeše (Woisky i Salatino, 1998). Za dobijanje radne smeše korišćeno je 4.1 ml 80%  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , 0.1 ml 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  i 0.1 ml 1M  $\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$ . Sadržaj je izmešan na vorteksu, a epruvete su pokrivene i ostavljene 40 minuta na tamnom mestu. Osnovni standard kvercetina dobijen je rastvaranjem 5 mg kvercetin hidrata (Mr 320 g/mol) u 96%  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  do 50

ml. Koncentracije 100, 50, 25 i 10 mg/ml su korišćeni za konstrukciju kalibracione krive. Slepa proba, umesto 600 µl uzorka, sadrži 600 µl 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH.

Na spektrofotometru su merene apsorbanca na talasnoj dužini 415 nm prema blanku. Apsorbanca slepe probe je prethodno merena prema 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH.

Koncentracija ukupnih flavonoida u originalnim uzorcima u ppm (mg/l) ekvivalentima kvercetina Qu su izračunate tako što su koncentracije dobijene na osnovu kalibracione krive pomnožene sa faktorom razblaženja.

### **3.2.4. Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti**

#### **3.2.4.1. DPPH metoda**

Određivanje potencijalne antioksidativne sposobnosti DPPH testom rađeno je spektrofotometrijski, metodom po Blois-u (Blois, 1958). Napravljen je rastvor DPPH radikala u metanolu koncentracije tolike da apsorpcija na 517 nm bude malo preko jedinice (koncentracija oko 5 µM), kako bi u reakciji sa potencijalnim antioksidansom (ispitivanim jedinjenjima) pala na vrednosti od 0.2 do 0.8 (usled potrošnje DPPH u reakciji). Koncentracije rastvora ekstrakata i ulja se biraju na osnovu probnih testova sa rastvorom DPPH po datom postupku. Ekstrakti se rastvaraju do odgovarajuće koncentracije (najčešće 1 mg/ml) i serijom razblaženja se dobijaju odgovarajući radni rastvori čija se apsorbanca meri spektrofotometrijski uz pomoć UV-Vis Shimadzu, PC 1650 spektrofotometra. Kao reagens se koristi 2,2-difenil, 1-pikril hidrazil (DPPH) u metanolu u koncentraciji 0.04 mg/ml. Postupak se sastoji u tome da se u 1800 µl rastvora DPPH doda 200 µl ispitivanog rastvora, promućka se i ostavi da stoji 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon 30 min boravka na tamnom mestu mere se apsorpcije rastvora na talasnoj dužini 517 nm. Posle postavljanja bazne linije meri se apsorpcija slepe probe odnosno samog DPPH rastvora (A<sub>0</sub>). U kivetu se sipa 200 µl uzorka i 1800 µl rastvora DPPH (A<sub>1</sub>). Sve koncentracije se rade u tri ponavljanja, a na isti način su tretirani vitamin C i BHA, poznati antioksidansi.

Smanjenje apsorpcije DPPH se izražava u %, a izračunava se preko sledeće formule:

$$\% \text{ smanjenja apsorpcije (na 517 nm)} = (A_0 - A_1) \times 100 / A_0$$

$A_0$  - srednja vrednost apsorpcije slepe probe;

$A_1$  - srednja vrednost apsorpcije uzorka

Koncentracije koje smanjuju apsorpciju DPPH rastvora za 50% ( $EC_{50}$ ) su dobijene sa kalibracione krive gde je predstavljena zavisnost apsorpcije DPPH rastvora na 517 nm i koncentracije za svaki uzorak i kontrole. Za određivanje ovih vrednosti korišćen je Origin 7.0 softver (Džamić, 2010).

#### **3.2.4.2. ABTS metoda**

Za dobijanje radne smeše korišćeno je 19.2 mg ABTS-a i 5 ml rastvora  $K_2O_8S_2$ . Rastvor  $K_2O_8S_2$  se dobija tako što se 33.3 mg  $K_2O_8S_2$  doda u destilovanu vodu do 50 ml. Smeša se ostavi da stoji 12-16 sati u mraku na sobnoj temperaturi. Pre svake analize vrši se probno merenje na talasnoj dužini od 734 nm. Tek onda dolazi do mešanja 75  $\mu$ l razblaženog uzorka i 3 ml smeše ABTS-a (Miller i Rice-Evans, 1997). Sadržaj je izmešan na vorteksu, a epruvete su pokrivene i ostavljene 30 minuta na 30° u vodeno kupatilo. Osnovni standard vitamina C dobijen je rastvaranjem 50 mg vitamina C (Mr 176.12 g/mol) u 1 ml destilovane vode. Zatim se uzima 10  $\mu$ l rastvora vitamina C i dodaje se destilovana voda do 10 ml. Rastvor vitamina C čuva se na ledu. Koncentracije 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.25, 1.5 i 2 mg/ml su korišćeni za konstrukciju kalibracione krive. Za kalibracionu krivu mereno je 6, 15, 30, 60, 75, 90 i 120  $\mu$ l standardnog rastvora vitamina C i smeše ABTS-a. Slepa proba, umesto 75  $\mu$ l uzorka, sadrži 75  $\mu$ l destilovane vode.

Na spektrofotometru su merene apsorbanca na talasnoj dužini 734 nm prema blanku. Apsorbanca slepe probe je prethodno merena prema destilovanoj vodi.

Koncentracija antioksidanata u originalnim uzorcima u ppm (mg/l) ekvivalentima vitamina C (VitC) su izračunate tako što su koncentracije dobijene na osnovu kalibracione krive pomnožene sa faktorom razblaženja.

### 3.2.5. Mikrodiluciona metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti *in vitro*

#### 3.2.5.1. Testiranje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata

Na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu izvršeno je antimikrobno (antibakterijsko i antifungalno) testiranje etarskih ulja na sledeći način. Od prekonocnih kultura ispitivanih test-sojeva mikroorganizama uzgajanih na hranljivom agaru je, u sterilnom fiziološkom rastvoru, napravljena suspenzija turbiditeta 0.5 McFarlanda koja sadži  $1.5 \times 10^8$  CFU /ml za bakterije i  $1.5 \times 10^7$  CFU /ml za kvasce (NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003). Nakon toga je, prema priloženom uputstvu, napravljena odgovarajuća podloge, Müller-Hinton bujon (Torlak) za bakterije i sladni bujon za gljive.

Sterilisane tečne podloge su razlivene po 10 ml u sterilne epruvete i inokulisane sa po 133 µl pripremljene suspenzije mikroorganizama da bi se dobio konačan broj CFU od  $2 \times 10^6$  po 1 ml. Zatim je napravljena serija duplih razređenja ulja u 5% DMSO-u, u rasponu od 0.05-100 µl/ml. U svako od 96 udubljenja mikrotitarske ploče je unešeno po 90 µl inokulisane podloge sa  $2 \times 10^6$ /ml CFU testirane kulture i po 10 µl od svakog razređenja etarskog ulja. Ukupna zapremina u bunariću je iznosila 100 µl, a gustina suspenzije  $2 \times 10^6$  CFU/ml. Mikrotitarske ploče su inkubirane na  $37^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 24h. Postupak je izveden u dva ponavljanja.

Mikrobiološki rast je očitavan dodavanjem po 20 µl, 0.5% vodenog rastvora trifenil tetrazolium hlorida (TTC) koji boji porasle kolonije u ružičasto (Sartoratto i sar., 2004). Koncentracija u kojoj nema vidljivog rasta predstavlja *minimalnu inhibitornu koncentraciju* - MIC. Da bi se odredila minimalna baktericidna/fungicidna - MBC/MFC koncentracija sadržaj svih bunarića (koji se nalaze ispred inhibitorne koncentracije) je prenešen na nove petri-ploče sa odgovarajućim čvrstim podlogama (MH agar i sladni agar - Torlak) i nakon inkubacije vršeno je brojanje poraslih kolonija. MBC/MFC se definiše kao koncentracija aktivne supstance koja ubija 99.5% bakterija, tj. gljiva (NCCLS standard – National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003).

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata korišćena je Mikrodiluciona metoda. Eksperiment je izvršen na isti način kao i kod ispitivanja etarskih ulja, sa tom

razlikom što je u bunariće unošeno po 100 µl ekstrakta (100 mg/ml u 30% metanolu za metanolne i 100 mg/ml u 30% etanolu za etil-acetatne i acetonske ekstrakte, dok je vodeni ekstrakt rastvaran u 5% DMSO) u 100 µl tečne hranljive podloge, a zatim je pravljena serija duplih razblaženja.

### **3.2.5.2. Testiranje antimikrobne aktivnosti ekstraktata**

Za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti ispitivanih ekstrakta u laboratoriji, Instituta za Biološka istraživanja “Siniša Stanković” u Beogradu korišćena je izmenjena metoda koju su dali Hanel i Raether, 1998 i Daouk i sar., 1995. Prekonoćne kulture bakterijskih vrsta su kultivisane na 37°C u Tryptic Soy Broth (TSB) podlozi. Spore gljiva su spirane sa površine agarozne ploče sterilnim 0.85% fiziološkim rastvorom koji sadrži 0.1% Tween 80 (v/v). Čelijske suspenzije bakterija i gljiva su regulisane pomoću sterilnog fiziološkog rastvora u koncentracijama od  $1.0 \times 10^5$  konačne zapremine od 100 µl. Inokulumi su ostavljeni na +4°C i pripremljeni za dalje testiranje. Razređenja inokuluma gajena su na čvrstom MH za bakterije i čvrstom MA za gljive da bi se utvrdilo odsustvo kontaminacije i proverila ispravnost inokuluma.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je utvđena serijom dilucionih tehnika koristeći mikrotitracione ploče sa 96 udubljenja. Ekstrakti su rastvoreni u 30% metanolu, 30 % etanolu i 5% DMSO-u (20 mg/ml) i dodati su u bujon medijuma sa inokulumom. Mikroploče su inkubirane 48 h na 37°C za bakterije i 72 h na 28°C, za gljive. Najniža koncentracija bez vidljivog rasta (koristeći binokularni mikroskop) je definisana kao MIC.

Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) kao i minimalna fungicidna koncentracija (MFC) određene su serijom subkultura od 2 ml u mikrotitar pločama koje sadrže 100 ml bujona, a zatim inkubirane 48 h na 37°C ili 72 h na 28°C. Minimalna koncentracija bez vidljivog rasta je definisana kao MBC/MFC, što ukazuje na 99.5% smrtnosti u odnosu na početni inokulum. Ampicilin i komercijalni fungicid, ketokonazol, su korišćeni kao pozitivna kontrola (0.1-5 mg/ml).



## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

U radu je vršena analiza trinaest taksona iz familije Apiaceae i to: *Eryngium serbicum*, *Seseli pallasii*, *S. libanotis* subsp. *libanotis*, *S. libanotis* subsp. *intermedium*, *Peucedanum officinale*, *P. longifolium*, *P. aegopodioides*, *P. alsaticum*, *Pastinaca sativa*, *Heracleum sphondylium*, *Tordylium maximum*, *Cachrys cristata* i *Opopanax hispidus*. Utvrđivano je dejstvo etarskih ulja i dobijenih ekstrakata na različite vrste bakterija i gljiva. Za ekstrakte je utvrđivan njihov antioksidativni potencijal. U **Tabeli 4.1** i **Tabela 4.2** dati su prinosi etarskih ulja kao i prinosi metanolnih, etil-acetanih, acetonskih i vodenih ekstrakata (na 100 g biljnog materijala).

**Tabela 4.1.** Prinosi etarskih ulja istraživanih vrsta.

Takson	Prinos etarskog ulja (g)
<i>Eryngium serbicum</i>	0.091
<i>Seseli pallasii</i>	0.098
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	0.129
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i>	0.153
<i>Peucedanum officinale</i>	0.094
<i>P. longifolium</i>	0.068
<i>P. aegopodioides</i>	0.027
<i>P. alsaticum</i>	0.017
<i>Pastinaca sativa</i>	0.100
<i>Heracleum sphondylium</i>	0.021
<i>Tordylium maximum</i>	0.007
<i>Cachrys cristata</i> (nadzemni deo)	0.014
<i>Cachrys cristata</i> (plod)	0.006
<i>Opopanax hispidus</i> (nadzemni deo)	0.011
<i>Opopanax hispidus</i> (cvast)	0.034
<i>Opopanax hispidus</i> (plod)	0.015

**Tabela 4.2.** Prinosi ekstrakata.

Takson	Metanolni ekstrakt (g)	Etil-acetatni ekstrakt (g)	Vodeni ekstrakt (g)	Acetonski ekstrakt (g)
<i>Eryngium serbicum</i>	1.043	0.186	0.993	0.275
<i>Seseli pallasii</i>	0.786	0.353	1.587	0.467
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1.132	0.378	1.017	0.295
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (nadzemni deo)	0.917	–	–	–
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	1.225	1.702	10.111	1.449
<i>Peucedanum officinale</i>	1.010	0.172	1.476	0.213
<i>P. longifolium</i>	2.090	0.757	1.318	0.390
<i>P. aegopodioides</i>	0.569	0.028	0.765	0.100
<i>P. alsaticum</i>	0.760	0.085	1.135	0.081
<i>Pastinaca sativa</i>	–	–	–	–
<i>Heracleum sphondylium</i>	0.388	0.087	0.624	0.179
<i>Tordylium maximum</i>	1.148	0.094	0.615	0.123
<i>Cachrys cristata</i> (nadzemni deo)	0.532	0.160	1.838	0.132
<i>Cachrys cristata</i> (plod)	0.919	0.656	0.789	0.535
<i>Opopanax hispidus</i> (nadzemni deo)	0.460	0.084	0.276	0.118
<i>Opopanax hispidus</i> (cvast)	1.595	0.302	–	–
<i>Opopanax hispidus</i> (plod)	1.674	0.190	–	–

#### 4.1. Analiza hemijskog sastava etarskih ulja

U ovom odeljku dati su rezultati kvantitativne i kvalitativne analize sastava etarskih ulja pojedinih taksona.

Korišćenjem metoda GC i GC-MS u etarskim uljima vrste *Cachrys cristata* identifikovano je 43 komponente u nadzemnom delu biljke što je 99.7% i 52 komponente u plodu što predstavlja 99.1%. Za oba ulja karakteristično je to da sadrže

visok procenat seskviterpena i oksidovanih seskviterpena, dok monoterpena nema. Dominantne komponente nadzemnog dela etarskog ulja vrste *C. cristata* su: fitol (13.1%), germakren D (12.9%),  $\beta$ -kariofilen (9.7%) i  $\beta$ -burbonen (8.5%) (**Grafik 4.1.1**), dok se u plodu sa najvećim procentom sreću komponente kao što su: suberozin (19.7%), germakren D (12.3%) i germakren B (10.0%) (**Grafik 4.1.2**). Zajedničko za njih je da sadrže germakren D kao najzastupljeniju komponentu (**Tabela 4.1.1**). U plodu se suberozin pojavljuje u najvećem procentu, dok se u nadzemnom delu javlja u tragovima. Ovo je prvi podatak o sastavu etarskog ulja *C. cristata* u Srbiji (Matejić i sar., 2012). U literaturi su pronađeni podaci o sastavu etarskog ulja ploda *C. cristata* u Turskoj. Özek i sar. (2007) navode da su glavne sledeće komponente: heksadekanska kiselina (11.6%), nonakozan (8.0%), germakren D (6.1%) i miristicin (4.4%). U etarskom ulju ploda *C. cristata* iz Srbije nisu detektovani heksadekanska kiselina i miristicin.

**Tabela 4.1.1.** Hemijski sastav etarskog ulja vrste *Cachrys cristata*.

Komponente	<i>C. cristata</i>			
	KIE <sup>1</sup>	KIL <sup>2</sup>	nadzemni deo (%)	plod (%)
borneol	1167.0	1165	0.9	–
terpinen-4-ol	1179.4	1174	0.3	–
<i>p</i> -cimen-8-ol	1189.8	1179	0.7	–
(E)-hrizantenil acetat	1227.5	1235	0.2	–
(Z)-hrizantenil acetat	1263.3	1261	0.5	–
bornil acetat	1286.8	1287	2.5	0.2
karvakrol	1299.1	1298	–	0.7
<i>p</i> -vinil-gvajakol	1315.9	1309	–	0.3
$\alpha$ -kubeben	1350.2	1345	0.2	0.2
$\alpha$ -kopaen	1371.5	1374	1.5	0.5
<b><math>\beta</math>-burbonen</b>	1385.6	1387	<b>8.5</b>	2.5
$\beta$ -kubeben	1390.7	1387	0.4	1.4
<b><math>\beta</math>-kariofilen</b>	1420.1	1417	<b>9.7</b>	4.1
$\beta$ -kopaen	1429.0	1430	–	3.0
$\beta$ -gurjunen	1429.5	1431	1.5	–

$\gamma$ -elemen	1434.4	1434	–	0.2
6,9-gvajadien	1444.8	1442	0.9	0.6
kadina-3,5-dien	1450.8	1448	0.3	–
$\alpha$ -humulen	1453.8	1452	1.8	1.3
izogermakren D	1466.4	n/a	–	0.6
(Z)-muroła-4(14),5-dien	1466.6	1465	1.0	–
$\gamma$ -murolen	1477.3	1478	–	0.4
<b>germakren D</b>	1483.4	1485	<b>12.9</b>	<b>12.3</b>
$\beta$ -selinen	1486.2	1489	–	0.4
(E)-muroła-4(14),5-dien	1491.8	1493	–	0.3
biciklogermakren	1496.1	1500	0.9	1.3
$\alpha$ -murolen	1501.0	1500	–	0.4
$\beta$ -bisabolen	1510.6	1505	3.1	2.0
$\gamma$ -kadinen	1517.6	1513	0.7	–
$\delta$ -kadinen	1525.1	1522	1.9	2.1
zonaren	1529.2	1528	–	0.8
selina-4(15),7(11)-dien	1535.4	1534	–	1.2
selina-3,7(11)-dien	1542.1	1545	–	2.7
n.i.=nije identifikovano	1551.5		–	0.4
<b>germakren B</b>	1557.3	1559	0.5	<b>10.0</b>
mintoksid	1567.7	1565	1.0	0.2
spatulenol	1580.2	1577	1.6	1.0
kariofilen-oksid	1584.8	1582	7.3	2.5
muroła-4,10(5)-dien-8 $\alpha$ -ol	1592.1	1594	1.8	–
salvial-4(14)-en-1-one	1594.8	1594	–	1.1
humulene-epoksid	1610.2	1608	–	0.5
$\beta$ -oplopenon	1614.7	1607	2.5	1.1
1,10-di-epi-kubenol**	1623.1	1618	–	1.0
1-epi-kubenol	1630.2	1627	0.4	0.8
kariofila-3(15),7(14)-dien-6-ol	1635.3	1635	0.6	–
kariofila-4,(12),8(13)-dien-5 $\alpha$ -ol	1639.1	1640	1.0	0.4
$\alpha$ -murolol (=toreiol)	1644.8	1644	1.0	1.3

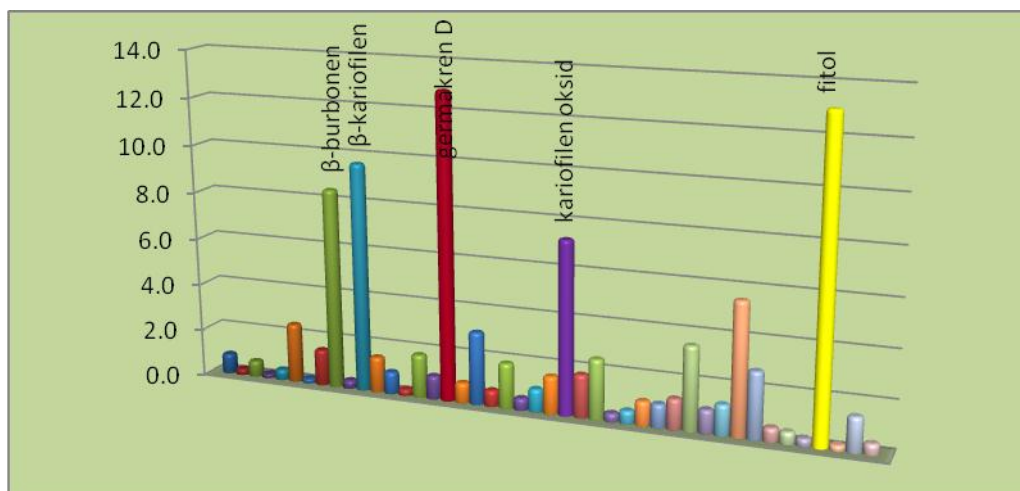
kedr-8(15)-en-10-ol	1649.7	1650	1.3	0.8
$\alpha$ -kadinol	1657.1	1652	3.5	3.0
14-hidroksi-9-epi-(E)-kariofilen	1674.6	1668	1.0	–
eudezma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol	1682.8	1687	1.3	0.5
amorfa-4,9-dien-2-ol	1689.3	1700	–	2.2
germakra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol	1689.5	1685	5.6	–
6 $\alpha$ -hidroksi-germakra-1(10),4-dien	1692.5	1700	–	0.9
2 $\alpha$ -hidroksi-amorfa-4,7(11)-dien	1768.2	1775	2.8	–
neofitadien (izomer III)	1841.0	1849	0.6	0.9
heksahidrofarnezil acetone	1847.7	1846	0.5	0.4
n.i.	1883.0		0.3	–
<b>fitol</b>	2117.3	2114	<b>13.1</b>	0.4
<b>suberozin</b>	2224.3	n/a	0.2	<b>19.7</b>
trikoza	2302.1	2300	1.5	0.7
tetrakoza	2402.6	2400	–	0.9
pentakoza	2503.1	2500	–	0.2
heksakoza	2602.8	2600	–	0.4
heptakoza	2703.9	2700	0.5	1.1
n.i.	2718.8		–	0.5
oktakoza	2803.5	2800	–	4.2
skvalen**	2830.9	n/a	–	1.2
nonakoza	2903.9	2900	–	2.6
Ugljovodonični monoterpeni <sup>a</sup>			0.0	0.0
Oksidovani monoterpeni <sup>b</sup>			2.5	0.7
Ugljovodonični seskviterpeni <sup>c</sup>			45.7	48.3
Oksidovani seskviterpeni <sup>d</sup>			32.9	36.7
Drugo <sup>e</sup>			19.0	14.3
Ukupno			100.0	100.0
Ukupno identificirano			<b>99.7</b>	<b>99.1</b>

<sup>1</sup> Kovačev (retencioni) indeks eksperimentalno određen (AMDIS)

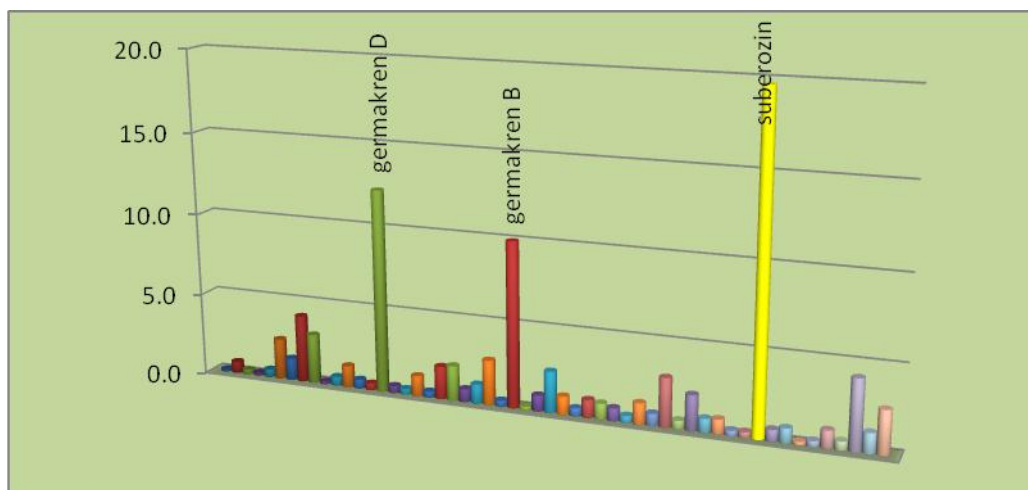
<sup>2</sup> Kovačev (retencioni) indeks literaturni podatak (Adams, 2007)

n.i.= nije identificirano

**Grafik 4.1.1.** Hemijski sastav etarskog ulja nadzemnog dela vrste *Cachrys cristata*.



**Grafik 4.1.2.** Hemijski sastav etarskog ulja ploda vrste *Cachrys cristata*.



U predhodnim istraživanjima, ispitivan je hemijski sastav etarskih ulja pojedinih vrsta koje su korišćene u ovom radu i došlo se do sledećih zaključaka. Rod *Peucedanum* se najjasnije izdvaja u odnosu na ostale rodove, bez obzira na to što vrste u okviru ovog roda ne formiraju homogene grupe. Vrste *P. longifolium* i *P. officinale*, kao glavnu komponentu imale su (-)- $\alpha$ -pinen (4.0–38.7%), dok je za vrstu *P. alsaticum*, dominantna komponenta bila (+)- $\alpha$ -pinen (15.0%). Najhomogenija grupa zabeležena je u okviru tribusa Tordylieae. *Pastinaca sativa* kao glavne komponente sadrži (Z)- $\beta$ -ocimen (10.8%) i lavandulol-acetat (5.2%), dok je etarsko ulje vrste *Tordylium maximum* okarakterisan prisustvom oktil izobutanoata (16.1%) i oktil-2-metilbutanoata (25.0%). Takođe, vrste koje pripadaju tribusu Apieae formiraju najheterogeniju grupu. *Libanotis*

*montana* je jedina vrsta iz ovog tribusa koja sadrži eudesma-4(15),7-dien-1- $\beta$ -ol (1.2%). Dobijeni rezultati istraživanih etarskih ulja vrsta u okviru subfamilije Apioideae predstavljaju složeni kompleks različitih jedinjenja. Rezultati PCA analize su pokazali da je došlo do grupisanja srodnih taksona u adekvatne tribuse, što potvrđuje hemotaksonmski značaj sastava etarskih ulja, čime se u većoj meri potvrđuju sadašnji taksonomski odnosi (Kapetanos i sar., 2008).

Na osnovu ranijih istraživanja pokazano je da etarsko ulje vrste *Eryngium serbicum* sadrži kao glavne komponente germakren D (19.7%),  $\beta$ -elemen (10.0%) i spatulenol (6.9%) (Capetanos i sar., 2007).

## 4.2. Rezultati antibakterijske i antifungalne aktivnosti

### 4.2.1. Uporedna analiza antibakterijske i antifungalne aktivnosti testiranih etarskih ulja

U ovom odeljku prikazan je uporedni pregled antibakterijske i antifungalne aktivnosti etarskih ulja dobijen korišćenjem metode mikrodilucije. Vrednosti minimalnih inhibitornih (MIC) i minimalnih fungicidnih koncentracija (MFC) izražene u mg/ml, prikazane su u **Tabeli 4.2.1.**

Ulja biljnih vrsta *Peucedanum officinale*, *P. longifolium*, *Pastinaca sativa*, *Seseli libanotis* ssp. *libanotis* su delovala na sve testirane sojeve u okviru ispitivanih koncentracija od 0.78-100 µl/ml. U tom opsegu etarska ulja sledećih vrsta *Eryngium serbicum*, *S. pallasii*, *Heracleum sphondylium* i *P. aegopodioides* na neke od sojeva nisu imala delovanje, dok ulja vrsta *Opopanax hispidus* (iz nadzemnog dela biljke), *O. hispidus* (iz ploda), *Cachrys cristata* i *Tordylium maximum* nisu pokazala aktivnost ni na jedan ispitivani soj. Jedan od razloga u nedetektovanju aktivnosti može biti i postojanje ograničene količine uzorka pa nije bilo moguće testirati veće koncentracije ulja.



Slika 4.2.1. Mikrotitraciona ploča (96 sistem) sa rezultatima dobijenim mikrodilucionom metodom za *Pseudomonas aeruginosa*.



Grupa Gram (-) bakterija je bila rezistentnija od grupe Gram (+) bakterija. Naročito otpornim se pokazao soj *Salmonella enteritidis* na koga su inhibitorno i baktericidno delovala ulja *P. longifolium* i *Pastinaca sativa* u koncentraciji od 100 µl/ml, dok su ulja *S. libanotis* ssp. *libanotis* i *P. officinale* imala aktivnost u koncentraciji od 50 µl/ml. Iznenadujuće osetljiv se pokazao soj *Pseudomonas aeruginosa* na koga je ulje biljne vrste *P. aegopodioides* imalo efekat u koncentraciji od 10 µl/ml, a ulja vrsta *P. officinale*, *P. longifolium*, *E. serbicum* u koncentraciji od 12.5 µl/ml (Slika 4.2.1). Na soj *Escherichia coli* ulja vrsta *P. officinale*, *P. longifolium* i *Pastinaca sativa* su bila aktivna u opsegu od MIC/MBC=25.0/100 µl/ml.

U grupi Gram (+) bakterija najosetljiviji je bio soj *Bacillus cereus* na koga su ulja delovala u opsegu od 0.78-12.5 µl/ml, sa najboljom aktivnošću ulja biljne vrste *Pastinaca sativa*. Soj *Staphylococcus aureus* je bio osetljiviji na prisustvo ulja sledećih vrsta *P. officinale*, *P. longifolium* i *E. serbicum* u opsegu od MIC=MBC=3.13 µl/ml. Na soj *Listeria monocytogenes* najbolju aktivnost je ispoljilo ulje vrste *P. aegopodioides*, ali dobro delovanje su imala i ulja *P. officinale*, *P. longifolium* i *H. sphondylium*.

Na kvasac *Candida albicans* su delovala ulja vrsta *P. officinale*, *P. longifolium*, *E. serbicum*, *S. pallasii*, *Pastinaca sativa*, *S. libanotis* ssp. *libanotis*, *H. sphondylium* i *P. aegopodioides* gde se kao ulje sa najboljom aktivnošću pokazalo ulje vrste *E. serbicum* (MIC/MFC=1.56/3.13 µl/ml).

Generalno, najbolju aktivnost je imalo ulje vrste *E. serbicum* koje nije delovalo na *S. enteritidis* ali je, u nižim koncentracijama, bilo aktivno na sojeve *P. aeruginosa* MIC=MBC=12.5 µl/ml, *B. cereus* i *S. aureus* MIC=MBC=3.13 µl/ml i na kvasac *C. albicans* MIC/MFC=1.56/3.13. Dobru aktivnost je imalo i ulje *P. aegopodioides* koje je na *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* i *C. albicans* delovalo u koncentraciji od MIC=MBC(MFC)=10.0 µl/ml, dok je rast soja *B. cereus* bio inhibiran na koncentraciji od 2.50 µl/ml. Najveća testirana koncentracija ovog ulja (usled ograničene količine uzorka) je bila 10.0 µl/ml i ona nije delovala na *E. coli*, *S. enteritidis* i *S. aureus*. Kao ulja sa dobrom aktivnošću su se izdvojila i ulja biljnih vrsta *P. officinale*, *P. longifolium*, dok su najslabije delovanje imala ulja *Pastinaca sativa* i *S. pallasii*. Međutim, ulje *P. sativa* je imalo najbolji rezultat u odnosu na sva testirana ulja protiv soja *B. cereus* (MIC=MBC=0.78). Kako je *B. cereus* izazivač kvarenja hrane, a vrsta *P.*

*sativa* začinska biljka, može se doći do zaključka da upravo ova biljna vrsta može služiti kao potencijalni konzervans u prehrambenoj industriji.

Dobijeni rezultati upućuju na zaključak da se ulja ispitivanih vrsta navedenih u **Tabeli 4.2.1.**, mogu, osim kao dodaci hrani za poboljšanje arome i mirisa, koristiti i kao prirodni konzervansi. S tim u vezi bi i buduća istraživanja trebalo usmeriti na hranu kao model sistema iz razloga što upravo ove bakterije koje dovode do kvaranja hrane u samoj hrani rastu u biofilm formacijama te su manje osjetljive nego u tečnoj kulturi. Osim toga, na taj način treba ispitati i da li koncentracije ulja koje deluju antimikrobno ne menjaju drastično miris i ukus prehrambenog proizvoda koga treba konzervirati ili možda deluju citotoksično na ljudski organizam.

**Tabela 4.2.1.** Antimikrobna aktivnost etarskih ulja (MIC i MBC/MFC- µl/ml).

	Etarska ulja (MIC/MBC(MFC) u µl/ml)								Referentni antibiotik (MIC/MBC(MFC) u µg/ml)
	<i>Eryngium serbicum</i>	<i>Seseli pallasii</i>	<i>Seseli libanotis</i> ssp. <i>libanotis</i>	<i>Peucedanum officinale</i>	<i>Peucedanum longifolium</i>	<i>Peucedanum aegopodioides</i>	<i>Pastinaca sativa</i>	<i>Heracleum sphondylium</i>	
<b>Gram (-) bakterije</b>									<b>Streptomycin</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	50.0/100	50.0/>100	50.0/100	25.0/100	25.0/100	>10.0/>10.0	25.0/100	>50.0/>50.0	16.0/16.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	12.5/12.5	25.0/25.0	25.0/25.0	12.5/12.5	12.5/12.5	10.0/10.0	50.0/50.0	25.0/25.0	8.0/8.0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	>100/>100	>100/>100	50.0/50.0	50.0/50.0	100/100	>10.0/>10.0	100/100	>50.0/>50.0	4.0/4.0
<b>Gram (+) bakterije</b>									<b>Hloramfenikol</b>
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	3.13/3.13	1.56/3.13	1.56/1.56	6.25/6.25	12.5/12.5	2.50/10.0	0.78/0.78	1.56/1.56	4.0/16.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	25.0/25.0	100/100	25.0/25.0	12.5/12.5	12.5/25.0	10.0/10.0	100/100	12.5/12.5	8.0/16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.13/3.13	50.0/50.0	12.5/25.0	3.13/3.13	3.13/3.13	>10.0/>10.0	50.0/50.0	12.5/12.5	1.0/8.0
<b>Kvasac</b>									<b>Nistatin</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1.56/3.13	50.0/50.0	25.0/25.0	25.0/25.0	12.5/12.5	10.0/10.0	50.0/50.0	25.0/25.0	16.0/16.0

#### 4.2.2. Uporedna analiza antibakterijske i antifungalne aktivnosti testiranih ekstrakata

U ovom delu dati su rezultati aktivnosti različitih ekstrakata u testovima antibakterijske i antifungalne analize *in vitro*, primenom mikrodilucione metode. Testirani su metanolni, etil-acetatni, vodeni i acetonski ekstrakti sledećih biljnih vrsta: *Eryngium serbicum*, *Seseli pallasii*, *S. libanotis* subsp. *libanotis*, *S. libanotis* subsp. *intermedium* (nadmerni deo i plod), *Peucedanum officinale*, *P. longifolium*, *P. aegopodioides*, *P. alsaticum*, *Heracleum sphondylium*, *Tordylium maximum*, *Cachrys cristata* (nadmerni deo i plod) i *Opopanax hispidus* (nadmerni deo, cvast i plod).

Antimikrobna aktivnost različitih ekstrakata nadmernog dela biljne vrste *E. serbicum* pokazuje da je etil-acetatni ekstrakt delovao bolje u odnosu na metanolni, a oba znatno bolje u odnosu na acetonski ekstrakt (**Tabela 4.2.2**). Takođe se može uočiti da su inhibitorne koncentracije znatno niže od baktericidnih, naročito za metanolni i etil-acetatni ekstrakt kod sojeva *S. enteritidis* i *S. aureus* (MIC/MBC=1.56-3.125/25.0->50.0 mg/ml) i acetonski kod *B. cereus* (MIC/MBC=1.56/>50.0 mg/ml). Vodeni ekstrakt u testiranim koncentracijama nije pokazao aktivnost na testirane patogene.

**Tabela 4.2.2.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata vrste *Eryngium serbicum*.

<i>E. serbicum</i>	Ekstrakti (MIC/MBC(MFC) u mg/ml)				Referentni antibiotik
	Metanolni	Etil-acetatni	Acetonski	Vodeni	MIC/MBC (MFC) u µg/ml
<b>Gram (-) bakterije</b>					<b>Streptomicin</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12.5/>50	3.125/>50	25/25	50/50	16.0/16.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	6.25/50	3.125/50	12.5/25	50/>50	8.0/8.0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	3.125/50	1.56/50	12.5/25	50/>50	4.0/4.0
<b>Gram (+) bakterije</b>					<b>Hloramfenikol</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	12.5/12.5	3.125/50	1.56/>50	50/50	4.0/16.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	6.25/50	12.5/25	6.25/25	50/>50	8.0/16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.56/25	1.56/>50	12.5/>50	50/>50	1.0/8.0
<b>Kvasac</b>					<b>Nistatin</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12.5/50	12.5/>50	12.5/50	50/>50	16.0/16.0

Na osnovu rezultata prikazanih u **Tabeli 4.2.3** zapaženo je da je antimikrobna aktivnost ekstrakata nadzemnog dela biljne vrste *Seseli pallasii* je generalno slabija u odnosu na vrste *S. libanotis* subsp. *libanotis* i *S. libanotis* subsp. *intermedium* testiranog roda *Seseli*. Većina ekstrakata na testirane sojeve nije imala baktericidno delovanje ni u najvišoj testiranoj koncentraciji. Izuzetak predstavljaju acetonski i vodeni ekstrakti koji sprečavaju rast *E. coli*, *B. cereus* i *C. albicans*, kao i delovanje sva tri tipa ekstrakta koja (osim vodenog) na *L. monocytogenes* i *S. aureus*, gde su MBC vrednosti bile od 3.125-50.0 mg/ml. Ubedljivo najbolju aktivnost je imao acetonski ekstrakt vrste *S. pallasii* na

bakterijsku vrstu *B. cereus* sa najnižom minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIC/MBC=1.56/12.5).

**Tabela 4.2.3.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata vrste *Seseli pallasii*.

<i>S. pallasii</i>	Ekstrakti (MIC/MBC(MFC) u mg/ml)				Referentni antibiotik
	Metanolni	Etil-acetatni	Acetonski	Vodeni	MIC/MBC (MFC) u µg/ml
<b>Gram (-) bakterije</b>					<b>Streptomicin</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12.5/>50	1.56/>50	25/50	50/50	16.0/16.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.39/>50	0.78/>50	0.78/>50	50/>50	8.0/8.0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	6.25/>50	6.25/>50	50/>50	50/>50	4.0/4.0
<b>Gram (+) bakterije</b>					<b>Hloramfenikol</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	12.5/>50	0.39/>50	1.56/12.5	50/50	4.0/16.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	6.25/12.5	25/25	3.125/3.125	50/>50	8.0/16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.125/25	0.39/50	12.5/50	50/>50	1.0/8.0
<b>Kvasac</b>					<b>Nistatin</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12.5/>50	6.25/>50	12.5/50	50/>50	16.0/16.0

Svi testirani ekstrakti nadzemnog dela biljne vrste *Seseli libanotis* subsp. *libanotis* su pokazali antimikrobnu aktivnost na sve testirane sojeve mikroorganizama (**Tabela 4.2.4**). Grupa Gram (+) bakterija (MIC/MBC=0.78-50.0/6.25->50.0 mg/ml) je bila osetljivija u odnosu na grupu Gram (-) bakterija (MIC/MBC=0.78-50.0/12.5->50.0 mg/ml). Naročito osetljiv se pokazao soj *B. cereus* sa naboljim delovanjem acetonskog i vodenog ekstrakta (MIC/MBC=1.56/25.0 mg/ml). Kao i u slučaju ekstrakata biljne vrste *S. libanotis*

subsp. *intermedium*, metanolni ekstrakt je imao niže inhibitorne koncentracije, ali je acetonski ekstrakt imao bolje mikrobicidne aktivnosti, osim kod soja *S. aureus* kod koga nije delovala ni najviša testirana koncentracija tog ekstrakta. Najbolju aktivnost je imao metanolni ekstrakt na sojeve *L. monocytogenes* i *S. aureus* (MIC/MBC=3.125/12.5 mg/ml), kao i acetonski ekstrakt na *L. monocytogenes* (MIC=MBC=6.25 mg/ml).

**Tabela 4.2.4.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata vrste *Seseli libanotis* subsp. *libanotis*.

<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	Ekstrakti (MIC/MBC(MFC) u mg/ml)				Referentni antibiotik
	Metanolni	Etil- acetatni	Acetonski	Vodeni	MIC/MBC (MFC) u µg/ml
<b>Gram (-) bakterije</b>					<b>Streptomicin</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25/>50	6.25/12.5	25/25	25/25	16.0/16.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.78/>50	1.56/>50	12.5/50	50/>50	8.0/8.0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	6.25/>50	6.25/>50	50/>50	50/>50	4.0/4.0
<b>Gram (+) bakterije</b>					<b>Hloramfenikol</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	3.125/25	0.78/50	1.56/25	1.56/25	4.0/16.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	3.125/12.5	12.5/12.5	6.25/6.25	25/50	8.0/16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.125/12.5	3.125/>50	3.125/>50	50/>50	1.0/8.0
<b>Kvasac</b>					<b>Nistatin</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6.25/50	3.125/50	25/25	25/>50	16.0/16.0

Kada se sumiraju rezultati antimikrobne aktivnosti nadzemnog dela biljke i ploda biljne vrste *Seseli libanotis* subsp. *intermedium* mogu se izvesti određeni zaključci (**Tabela 4.2.5**). Vodeni ekstrakt ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije imao nikakvo

antimikrobno delovanje. Metanolni ekstrakt i nadzemnog dela biljke i ploda je delovao slično pri čemu su inhibitorne koncentracije bile jako niske (MIC=0.20-12.5 mg/ml) ali je baktericidno delovanje kod Gram (-) bakterija i *C. albicans* izostalo, dok je MBC kod Gram (+) bakterija bio u opsegu od 6.25-25.0 mg/ml.

**Tabela 4.2.5.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata vrste *Seseli libanotis* subsp. *intermedium*.

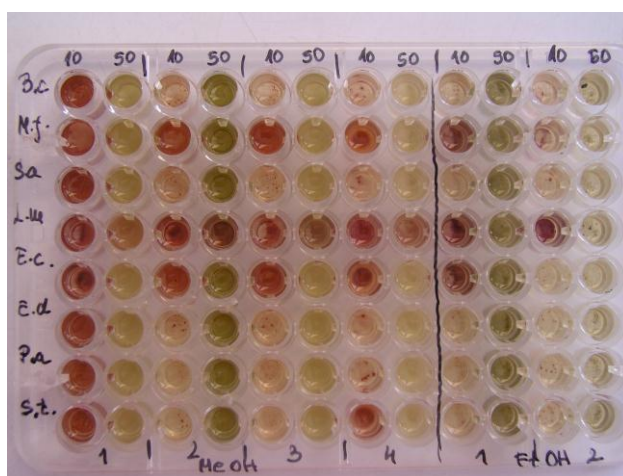
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i>	Ekstrakti (MIC/MBC(MFC) u mg/ml)					Referentni antibiotik MIC/MBC (MFC) u µg/ml
	Metanolni (nadzemni deo)	Metanolni (plod)	Etil- acetatni (plod)	Acetonski (plod)	Vodeni (plod)	
<b>Gram (-) bakterije</b>						<b>Streptomic.</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12.5/>50	0.78/>50	6.25/12.5	12.5/25	50/>50	16.0/16.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	1.56/50	0.20/>50	12.5/12.5	12.5/25	50/>50	8.0/8.0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	6.25/50	0.39/>50	0.78/50	25/>50	50/>50	4.0/4.0
<b>Gram (+) bakterije</b>						<b>Hloramfen.</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0.78/25	0.78/25	1.56/1.56	1.56/3.125	50/>50	4.0/16.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	1.56/6.25	0.78/12.5	1.56/50	1.56/1.56	50/>50	8.0/16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.78/25	0.78/25.0	0.78/50	0.78/50	50/>50	1.0/8.0
<b>Kvasac</b>						<b>Nistatin</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	3.125/>50	0.78/>50	3.125/>50	3.125/50	50/>50	16.0/16.0

Najosetljivija je bila *L. monocytogenes* na koju je metanolni ekstrakt nadzemnog dela biljke delovao u koncentracijama od MIC/MBC=1.56/6.25 mg/ml. Etil-acetatni i acetonski ekstrakt su delovali slično. Iako su njihove inhibitorne koncentracije nešto veće nego kod metanolnih ekstrakata, MIC=0.78-25.0 mg/ml, baktericidne koncentracije su bile niže, u odnosu na Gram (-) bakterija. Etil-acetatni ekstrakt ploda je najbolje delovao na *B.*



*ceruus* (MIC=MBC=1.56 mg/ml) i *E. coli* (MIC/MBC=6.25/12.5 mg/ml), dok je acetonski ekstrakt ploda najbolje delovao protiv *B. ceruus* (MIC/MBC=1.56/3.125 mg/ml) i *L. monocytogenes* (MIC=MBC=1.56 mg/ml) (**Tabela 4.2.5**).

Antibakterijska aktivnost testiranih ekstrakata različitih vrsta roda *Peucedanum* je prikazana na **Slici 4.2.2** koristeći se mikrodilucionom metodom. Testirani ekstrakti pomenutih vrsta roda *Peucedanum* pokazuju antibakterijsku aktivnost na sve bakterijske sojeve, ali u različitom opsegu. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) se kretala od 5.0-160.0 mg/ml, dok je minimalna baktericidna koncentracija (MBC) imala vrednosti od 10.0-160.0 mg/ml.



**Slika 4.2.2.** Mikrotitraciona ploča sa rezultatima dobijenim testiranjem antimikrobne aktivnosti metanolnih i etil-acetatnih ekstrakata četiri vrste roda *Peucedanum*.

Antibakterijski potencijal ekstrakata vrsta roda *Peucedanum* se može predstaviti na sledeći način: aceton > etil-acetat > metanol > voda. Najbolju antibakterijsku aktivnost pokazivao je acetonski ekstrakt vrste *P. longifolium*, MIC je bio u opsegu od 5.0-20.0 mg/ml, a MBC je od 10.0-40.0 mg/ml. Uopšteno gledano, najslabiju antimikrobnu aktivnost imali su vodeni ekstrakti svih ispitivanih vrsta roda *Peucedanum*. Najosetljivija bakterijska vrsta je bila *S. typhimurium* sa MIC od 15.0-120.0 mg/ml i MBC od 20.0-160.0 mg/ml. *L. monocytogenes* se pokazala kao najotpornija bakterijska vrsta sa inhibitornom aktivnošću između 20.0-160.0 mg/ml, i startnom baktericidnom od 40.0 mg/ml ne više od

>160.0 mg/ml za vodene ekstrakte. Ampicilin, standardni lek, je korišćen kao pozitivna kontrola. Opseg delovanja MIC za ampicilin bio je od 0.1-0.3 mg/ml i MBC 0.15-0.5 mg/ml. Poređenjem biološke aktivnosti ekstrakta sa komercijalnim antibiotikom, može se uočiti da testirani uzorci pokazuju slabiji antibakterijski potencijal (**Tabela 4.2.6**).

U ranijim istraživanjima pokazano je da antimikrobna aktivnost heksanskih ekstrakata iz ploda vrste *P. alsaticum* i *P. cervaria* poseduju inhibitornu aktivnost na Gram-pozitivne sojeve testirane sa različitim MIC vrednostima (0.25–2.0 mg/ml); inače, ekstrakt vrste *P. alsaticum* poseduje jaču antimikrobnu aktivnost i širi spektar delovanja. Rast Gram-negativnih bakterija i kvasca *Candida* spp. nije bio inhibitoran ni sa najvećim testiranim koncentracijama (MIC>4.0 mg/ml) (Skalicka-Woźniak i sar., 2010).

**Tabela 4.2.6.** Antibakterijska aktivnost različitih ekstrakata analiziranih vrsta roda *Peucedanum*.

		Gram (+) bakterije				Gram (-) bakterije			
		<i>B. cereus</i>	<i>M. flavus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
		Ekstrakti (MIC/MBC u mg/ml)							
Metanolni ekstrakti	<i>P. officinale</i>	20/30	40/50	20/30	40/60	30/40	20/30	20/30	20/30
	<i>P. longifolium</i>	20/30	30/40	20/30	40/60	30/40	20/30	20/30	30/40
	<i>P. aegopodioides</i>	20/30	40/50	20/30	40/60	30/40	20/30	20/30	20/30
	<i>P. alsaticum</i>	30/50	30/50	30/50	30/50	30/50	30/50	30/40	30/60
Etil-acetatni ekstrakti	<i>P. officinale</i>	20/30	30/40	20/30	40/60	20/40	15/20	20/20	15/20
	<i>P. longifolium</i>	20/30	40/40	30/40	30/40	30/40	20/30	15/20	15/20
	<i>P. alsaticum</i>	20/30	20/40	15/20	20/40	20/40	15/20	15/20	15/20
Vodeni ekstrakti	<i>P. officinale</i>	140/160	160/	140/	140/	-	120/	120/	120/160
	<i>P. longifolium</i>	120/	160/	120/	140/	160/	120/	160/	120/
	<i>P. aegopodioides</i>	120/160	160/	140/	140/	140/	120/	120/140	120/160
	<i>P. alsaticum</i>	140/	-	-	160/	-	140/	-	140/
Acetonski ekstrakti	<i>P. officinale</i>	20/30	30/40	20/30	30/40	15/20	15/20	10.0/15	15/20
	<i>P. longifolium</i>	5.0/10	20/30	15/20	20/40	20/30	10.0/15	15/20	15/20
	<i>P. alsaticum</i>	10.0/15	20/30	15/20	20/40	20/40	10.0/15	10.0/15	20/30
	<b>Ampicilin</b>	0.1/0.15	0.1/0.15	0.1/0.15	0.15/0.3	0.15/0.2	0.15/0.2	0.3/0.5	0.1/0.2

Rezultati antifungalne aktivnosti analiziranih vrsta roda *Peucedanum* prikazani su u **Tabeli 4.2.7**. Svi testirani ekstrakti pokazivali su antifungalnu aktivnost, pri čemu je MIC bio u opsegu 10.0-160.0 mg/ml i MFC 20.0-160.0 mg/ml. Antifungalni potencijal se može prikazati na sledeći način: aceton > etil acetat > metanol > vodeni ekstrakt. Najbolju antifungalnu aktivnost imao je acetonski ekstrakt vrste *P. alsaticum* sa inhibitornom aktivnošću od 10.0-40.0 mg/ml i fungicidnom od 20.0-60.0 mg/ml. Najslabija antifungalna aktivnost se može uočiti kod vodenih ekstrakata, svi testirani ekstrakti imali su MIC sa startnom koncentracijom od 120.0 mg/ml i MFC 160.0 mg/ml. Za mnoge vrste gljiva nije detektovana inhibitorna i fungicidna aktivnost za vodene ekstrakte. *A. ochraceus* je bila najosetljivija sa MIC od 10.0-120.0 mg/ml i MFC od 20.0-160.0 mg/ml, dok je *C. albicans* bila najrezistentnija sa MIC od 40.0-160.0 mg/ml i MFC od 60.0 mg/ml ne više od >160.0 mg/ml. Ketokonazol, kao sintetički fungicid je pokazivao inhibitornu aktivnost od 0.15-2.5 mg/ml i fungicidnu od 0.5-3.0 mg/ml, što ukazuje na to da su sintetički fungicidi imali bolju antifungalnu aktivnost u odnosu na testirane ekstrakte. Na osnovu ovoga se može zaključiti da različite vrste bakterija i gljiva, različito reaguju na različiti tip ekstrakta, a samim tim i na pojedine komponente iz njih.

**Tabela 4.2.7.** Antifungalna aktivnost različitih ekstrakata analiziranih vrsta roda *Peucedanum*.

		Testirane mikromicete								
		<i>P. funiculosum</i>	<i>P. ochrochloron</i>	<i>T. viride</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>C. albicans</i>	
		<b>Ekstrakti (MIC/MFC u mg/ml)</b>								
Etil- acetatni ekstrakti	Metanolni ekstrakti	<i>P. officinale</i>	20/60	20/50	20/60	20/60	10.0/50	20/40	20/50	50/70
		<i>P. longifolium</i>	20/60	15/40	20/50	20/50	20/50	15/40	15/40	40/80
		<i>P. aegopodioides</i>	20/60	20/60	20/50	20/50	20/50	20/40	20/50	40/60
Vodeni ekstrakti		<i>P. alsaticum</i>	20/60	20/50	20/50	30/60	10.0/40	20/50	20/40	40/60
		<i>P. officinale</i>	40/60	20/30	10.0/20	20/50	40/60	10.0/20	15/20	40/70
		<i>P. longifolium</i>	40/60	20/60	20/50	20/60	30/60	20/60	20/60	50/60
Acetonski ekstrakti		<i>P. alsaticum</i>	30/60	20/30	20/30	20/40	20/30	10.0/30	10.0/20	50/60
		<i>P. officinale</i>	140/	140/	-	160/	120/	120/160	120/160	140/
		<i>P. longifolium</i>	160/	160/	-	160/	160/	120/	120/	160/
		<i>P. aegopodioides</i>	140/	140/	140/160	140/	120/	140/160	120/140	140/
		<i>P. alsaticum</i>	160/	140/	100/	160/	160/	120/160	120/160	160/
		<i>P. officinale</i>	40/60	20/40	20/50	30/60	30/60	20/40	10.0/40	50/80
		<i>P. longifolium</i>	15/30	20/30	20/40	20/50	15/30	15/20	15/20	50/70
		<i>P. alsaticum</i>	15/40	15/30	15/40	20/40	15/40	15/20	10.0/20	40/60
		<b>Ketokonazol</b>	0.2/0.5	0.5/1	2.5/3	0.2/0.5	2.5/2.5	0.2/0.5	1.5/2	0.2/0.5

Rezultati ispitivanja antimikrobnog delovanja ekstrakata (metanolni, acetonski i vodeni) nadzemnog dela biljne vrste *H. sphondylium* su pokazali da oni deluju na sve testirane sojeve mikroorganizama (**Tabela 4.2.8**). Najbolju aktivnost je pokazao metanolni ekstrakt koji je na sojeve *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* i *S. aureus* delovao inhibitorno u jako niskim koncentracijama od 0.39-3.125 mg/ml, ali u prva dva slučaja nije bilo baktericidnog delovanja. Acetonski ekstrakt je delovao dobro protiv *L. monocytogenes* (MIC=MBC=6.25 mg/ml) i *B. cereus*. (MIC/MBC=1.56/50.0 mg/ml). Vodeni ekstrakt je na ova dva soja, kao i na soj *E. coli* delovao u koncentraciji od MIC=MBC=25.0 mg/ml, dok je protiv soja *P. aeruginosa* bila aktivna najviša koncentracija MIC=MBC=50.0 mg/ml, što je jako značajno s obzirom da vodeni ekstrakti retko pokazuju aktivnost.

**Tabela 4.2.8.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata vrste *Heracleum sphondylium*.

<i>H. sphondylium</i>	Ekstrakti (MIC/MBC(MFC) u mg/ml)				Referentni antibiotik MIC/MBC (MFC) u µg/ml
	Metanolni	Etil-acetatni	Acetonski	Vodeni	
<b>Gram (-) bakterije</b>					<b>Streptomycin</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25/50	nt	25/50	25/25	16.0/16.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.39/>50	nt	25/50	50/>50	8.0/8.0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	3.125/>50	nt	12.5/50	50/>50	4.0/4.0
<b>Gram (+) bakterije</b>					<b>Hloramfenikol</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	25/50	nt	1.56/50	25/25	4.0/16.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	12.5/12.5	nt	6.25/6.25	25/25	8.0/16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.56/25	nt	25/25	25/50	1.0/8.0
<b>Kvasac</b>					<b>Nistatin</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12.5/>50	nt	50/50	25/50	16.0/16.0

nt-nije testiran

Rezultati antimikrobne aktivnosti ekstrakata biljne vrste *Tordylium maximum* su pokazali da metanolni ekstrakt poseduje inhibitornu antimikrobnu aktivnost na sve testirane sojeve u koncentracijama od 0.78-25.0 mg/ml, dok vodeni ekstrakt nije pokazivao inhibitornu antimikrobnu aktivnost na testirane sojeve (**Tabela 4.2.9**). Za ostale ekstrakte nije utvrđena aktivnost zbog nedostatka istih. Testirani ekstrakt je najbolje delovao na soj *Bacillus cereus* sa inhibitornom koncentracijom od 1.56 mg/ml i baktericidnom koncentracijom od 25.0 mg/ml. Osim za sojeve *E. coli*, *B. cereus* i *S. aureus*, svi ostali sojevi nisu pokazali baktericidnu/fungicidnu aktivnost čak i pri najvećim testiranim koncentracijama od 50.0 mg/ml (Matejić i sar., 2013).

**Tabela 4.2.9.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata vrste *Tordylium maximum*.

<i>T. maximum</i>	Ekstrakti (MIC/MBC(MFC) u mg/ml)				Referentni antibiotik MIC/MBC (MFC) u µg/ml
	Metanolni	Etil-acetatni	Acetonski	Vodeni	
<b>Gram (-) bakterije</b>					<b>Streptomycin</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25/50	nt	nt	50/>50	16.0/16.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.78/>50	nt	nt	50/>50	8.0/8.0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	1.56/>50	nt	nt	50/>50	4.0/4.0
<b>Gram (+) bakterije</b>					<b>Hloramfenikol</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	1.56/25	nt	nt	50/>50	4.0/16.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	6.25/>50	nt	nt	50/>50	8.0/16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.13/25	nt	nt	50/>50	1.0/8.0
<b>Kvasac</b>					<b>Nistatin</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12.5/>50	nt	nt	50/>50	16.0/16.0

nt-nije testiran

Svi testirani ekstrakti (osim vodenog) biljne vrste *C. cristata* su pokazali inhibitornu aktivnost na sve testirane sojeve mikroorganizama u koncentracijama MIC=0.39-25.0 mg/ml. Baktericidne koncentracije su kod pojedinih sojeva mnogo veće ili nisu delovale ni na najviše testirane koncentracije od 50.0 mg/ml. Najbolje aktivnosti su imali etil-acetatni ekstrakti nadzemnog dela i ploda biljne vrste *C. cristata*, koji su na Gram (+) bakterije delovali i inhibitorno i baktericidno u koncentracijama 0.78-6.25 mg/ml. Ovi ekstrakti su na soj *P. aeruginosa* delovali inhibitorno sa 3.125-6.25 mg/ml, međutim na ovaj soj ni najviša koncentracija nije delovala baktericidno. To se može uočiti i kod soja *C. albicans*. Nešto slabije su delovali metanolni ekstrakti nadzemnog dela biljke i ploda koji takođe u niskim koncentracijama imaju inhibitorno delovanje. Baktericidnog delovanja je bilo, ali pri znatno većim koncentracijama (*L. monocytogenes* i *S. aureus*) ili je izostalo (kod svih ostalih testiranih sojeva). Acetonski ekstrakt je, osim na soj *B. cereus*, delovao znatno slabije od metanolnih i etil-acetatnih ekstrakata, ali je interesantno da je on pokazao baktericidan efekat pri koncentraciji od 50.0 mg/ml. Generalno, najosetljiviji soj se pokazao *B. cereus* koji je čest izazivač kvarenja hrane, tako da bi u budućim istraživanjima trebalo ispitati antimikrobno delovanje ekstrakata protiv ove bakterije u hrani kao model sistemu (**Tabela 4.2.10**).



**Tabela 4.2.10.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata vrste *Cachrys cristata*.

<i>C. cristata</i>	Ekstrakti (MIC/MBC(MFC) u mg/ml)						Referentni antibiotik
	Metanolni (nadzemni deo)	Etil-acetatni (nadzemni deo)	Metanolni (plod)	Etil-acetatni (plod)	Acetonski (plod)	Vodeni (plod)	MIC/MBC (MFC) u µg/ml
<b>Gram (-) bakterije</b>							<b>Streptomicin</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.78/>50	25/50	25/50	25/50	25/50	>50/>50	16.0/16.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.78/>50	6.25/>50	0.78/>50	3.125/>50	25/50	>50/>50	8.0/8.0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	0.78/>50	12.5/12.5	1.56/>50	12.5/12.5	25/>50	>50/>50	4.0/4.0
<b>Gram (+) bakterije</b>							<b>Hloramfenikol</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0.78/>50	0.78/1.56	1.56/25	0.78/1.56	1.56/3.125	>50/>50	4.0/16.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	12.5/12.5	0.78/1.56	6.25/>50	0.78/1.56	12.5/12.5	>50/>50	8.0/16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.39/12.5	0.78/6.25	3.13/25	0.78/6.25	25/50	>50/>50	1.0/8.0
<b>Kvasac</b>							<b>Nistatin</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6.25/>50	0.78/50	12.5/>50	0.78/50	6.25/50	>50/>50	16.0/16.0

Od biljnog materijala *Opopanax hispidus* (nadzemnog dela, cvasti i ploda) su napravljeni metanolni, etil-acetatni, acetonski i vodeni ekstrakti i komparativno je ispitivana njihova antimikrobna aktivnost (**Tabela 4.2.11**). Pregledom dobijenih rezultata za ekstrakte se može uočiti da nema značajne razlike između aktivnosti koju pokazuju različiti delovi nadzemnog dela biljke, osim neznatno bolje aktivnosti ekstrakata koji su dobijeni iz cvasti. Međutim, može se uočiti značajna razlika između različitih tipova ekstrakata u zavisnosti od upotrebljenog rastvarača. Metanolni ekstrakti pokazuju bolju inhibitornu aktivnost u opsegu od 0.78 do 12.5 mg/ml (sa izuzetkom soj *C. albicans* na koga su delovali slabije), ali je za baktericidnu aktivnost bila potrebna veća koncentracija u opsegu od 12.5 do 50.0 mg/ml (metanolni ekstrakt cvasti) ili je ona izostala, naročito kod grupe Gram (-) bakterija. S druge strane, iako etil-acetatni ekstrakti deluju nešto slabije oni pokazuju baktericidni efekat MBC=6.25-50.0 mg/ml (naročito ekstrakt dobijen iz cvasti koji nije delovao mikrobicidno samo na *S. aureus* i *C. albicans*). Vodeni ekstrakt nije delovao ni na jedan ispitivan soj. Najveća razlika između koncentracije koja deluje inhibitorno (MIC=1.56-6.25 mg/ml) i baktericidno (MBC=50.0->50.0 mg/ml) je izmerena kod soja *S. aureus*. Kao najosetljiviji sojevi su se pokazali *L. monocytogenes* na etil-acetatni ekstrakt dobijen iz ploda (MIC/MBC=3.125/6.25 mg/ml) i *E. coli* na etil-acetatni ekstrakt dobijen iz cvasti (MIC=MBC=6.25 mg/ml).

**Tabela 4.2.11.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata vrste *Opopanax hispidus*.

<i>O. hispidus</i>	Ekstrakti (MIC/MBC(MFC) u mg/ml)						Referentni antibiotik
	Metanolni (nadzemni deo)	Vodeni (nadzemni deo)	Metanolni (plod)	Etil-acetatni (plod)	Metanolni (cvast)	Etil-acetatni (cvast)	MIC/MBC (MFC) u µg/ml
<b>Gram (-) bakterije</b>							<b>Streptomycin</b>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3.125/>50	>50/>50	3.125/50	6.25/50	6.25/12.5	6.25/6.25	16.0/16.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.78/>50	>50/>50	0.78/>50	3.125/>50	1.56/50	6.25/50	8.0/8.0
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	1.56/>50	>50/>50	3.125/>50	12.5/25	1.56/50	12.5/25	4.0/4.0
<b>Gram (+) bakterije</b>							<b>Hloramfenikol</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	6.25/>50	>50/>50	3.125/>50	1.56/>50	3.125/12.5	1.56/50	4.0/16.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313	6.25/25	>50/>50	6.25/25	3.125/6.25	6.25/12.5	12.5/12.5	8.0/16.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.56/50	>50/>50	1.56/50	3.125/>50	1.56/50	6.25/>50	1.0/8.0
<b>Kvasac</b>							<b>Nistatin</b>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	6.25/50	>50/>50	6.25/50	12.5/>50	12.5/50	12.5/>50	16.0/16.0

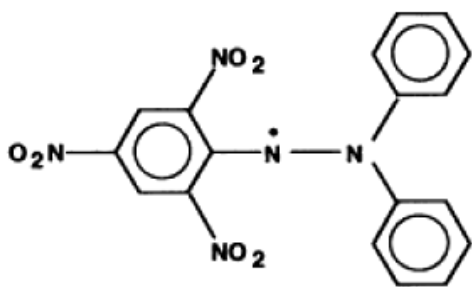
Kada se uporede rezultati antimikrobnog ispitivanja različitih tipova ekstrakata biljnih vrsta: *Eryngium serbicum*, *Seseli pallasii*, *S. libanotis* subsp. *libanotis*, *S. libanotis* subsp. *intermedium* (nadzemni deo i plod), *Heracleum sphondylium*, *Tordylium maximum*, *Cachrys cristata* (nadzemni deo i plod) i *Opopanax hispidus* (nadzemni deo, cvast i plod) može uočiti da metanolni ekstrakti pokazuju najbolje inhibitorno dejstvo (osim kod vrste *C. cristata* kod koje je najbolju aktivnost imao etil-acetatni ekstrakt) ali su baktericidne koncentracije ili mnogo veće ili nije bila aktivna na najvišoj testiranoj koncentraciji od 50.0 mg/ml. Iako su acetonski ekstrakti generalno imali najslabiju aktivnost (sa izuzetkom vodenih ekstrakata) oni su mikrobicidno delovali u nižim koncentracijama i u testiranim opsezima u odnosu na metanolne i etil-acetatne ekstrakte. Takođe, može se uočiti da u većini slučajeva vodeni ekstrakt nije imao nikakvo delovanje, sa izuzetkom vodenog ekstrakta *Seseli libanotis* subsp. *libanotis* koji je na *E. coli*, *B. cereus* i *L. monocitogenes* delovao inhibitorno u opsegu MIC od 1.56 do 25.0 mg/ml i baktericidno u koncentracijama MBC=25.0-50.0 mg/ml. Došlo se do zaključka da ne postoji značajna razlika u delovanju istih tipova ekstrakata dobijenih iz različitih delova biljke (nadzemni deo, cvasti i plod). Jedino su ekstrakti dobijeni iz cvasti vrste *O. hispidus* pokazali malo jače dejstvo u odnosu na ekstrakte iz drugih delove biljke. U okviru roda *Seseli* može se uočiti bolja aktivnost ekstrakata *S. libanotis* subsp. *libanotis* u odnosu na ekstrakte *S. pallasii*. Osim toga ekstrakti *S. libanotis* subsp. *libanotis* su takođe delovala nešto bolje u odnosu na ekstrakte *S. libanotis* subsp. *intermedia*.

Generalno, grupa Gram (+) bakterija je bila osetljivija u odnosu na grupu Gram (-) bakterija, a naročito dobro delovanje je zabeleženo protiv sojeva *B. cereus* i *L. monocytogenes* koji su česti uzročnici kvarenja hrane, te se ove (uglavnom začinske) biljke mogu koristiti i kao prirodni konzervansi za hranu.

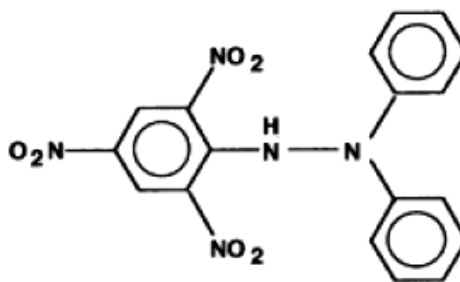
## 4.3. Uporedna analiza antioksidativne aktivnosti

### 4.3.1. DPPH test

Iz potrebe da se čovek zaštiti od štetnog uticaja slobodnih radikala u periodu od oko 50 godina osmišljene su brojne metode za merenje antioksidativnog kapaciteta i procenu efikasnosti antioksidativnih supstanci. U ovom radu korišćena je metoda DPPH analize zbog svoje jednostavnosti, brzine, osetljivosti i reproducibilnosti. Metoda ne zahteva posebnu pripremu uzoraka, skupe reagense, skupu opremu i brojnu radnu snagu. Naravno, postoje i ograničenja, pre svega, jer ne daje informacije o vrsti zaštićenog lipidnog supstrata, nespecifična je po pitanju vrsta hvatača radikala i ima delimičnu korelaciju sa ostalim metodama (Koleva i sar., 2002). DPPH je stabilan slobodni radikal sa delokalizovanim slobodnim elektronom na azotu, tako da molekul ne formira dimere, kao što bi bio slučaj sa većinom drugih slobodnih radikala (**Slika 4.3.1**). Delokalizacija omogućava pojavu ljubičaste boje, sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. Primajući proton od potencijalnog antioksidansa on se redukuje u hidrazin (žute boje) pri čemu se smanjuje intenzitet apsorpcije na 517 nm pošto hidrazin ne apsorbuje na toj talasnoj dužini. (**Slika 4.3.2**). Smanjenje apsorpcije na 517 nm je proporcionalno antioksidativnoj aktivnosti date supstance. Bitan parametar pomoću koga se tumače rezultati DPPH metode jeste "efikasna koncentracija" ili  $EC_{50}$  vrednost (drugačije  $IC_{50}$  vrednost). Definiše se kao koncentracija supstrata koja izaziva 50% gubitka DPPH aktivnosti odnosno boje (Brand-Williams i sar., 1995; Bondet i sar., 1997).



Slika 4.3.1. Difenilpikrilhidrazil (slobodni radikal)



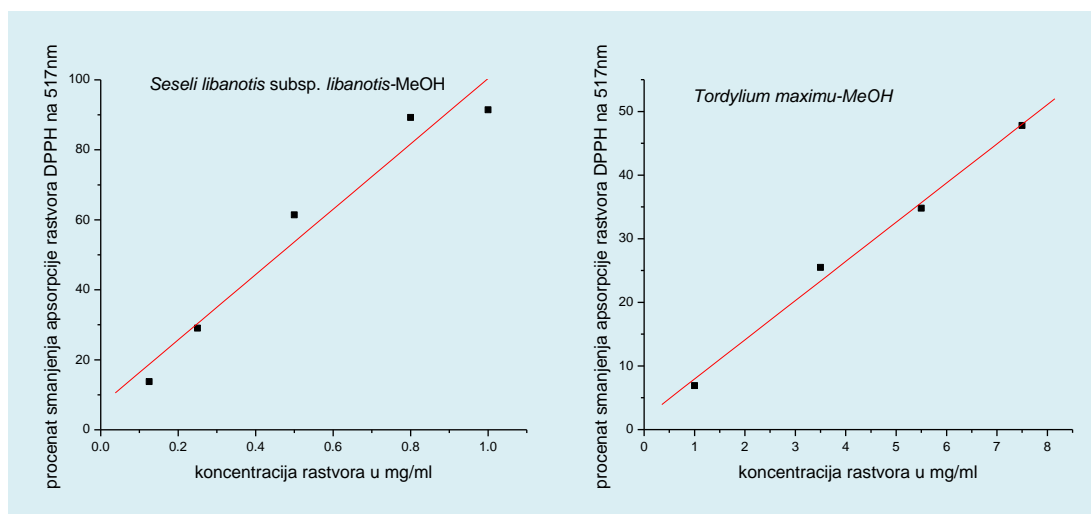
Slika 4.3.2. Difenilpikrilhidrazin

U ovom delu su predstavljeni rezultati potencijalne antioksidativne aktivnosti metanolnih, etil-acetatnih, vodenih i acetonskih ekstrakata.

U određivanju antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata značajni činioci su hemijski sastav biljnog materijala, metode ekstrakcije (prvenstveno rastvarač), geografsko poreklo, čuvanje materijala i procesuiranje u toku ekstrakcije (Ollanketo i sar., 2002). Vrednost  $EC_{50}$  predstavlja koncentraciju antioksidanta koja je potrebna da smanji koncentraciju DPPH radikala za 50%. Najniža  $EC_{50}$  vrednost odgovara najvišoj slobodno radikalskoj "sakupljačkoj" aktivnosti. Rezultati antioksidativnih merenja predstavljeni su u **Tabelama 4.3.1. - 4.3.4.** Za svaki uzorak postoji kalibraciona kriva, na osnovu koje je dobijena vrednost  $EC_{50}$ . Evidentno je da interakcija potencijalnih antioksidanasa sa DPPH radikalom zavisi od vrste ekstrakta i koncentracije.

Rezultati antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata koji su dobijeni iz suvog materijala analiziranih vrsta pokazali su sledeće vrednosti koje su se kretale u opsegu 0.460-7.825 mg/ml rastvora (**Tabela. 4.3.1**). Najjači efekat je zapažen kod metanolnog ekstrakta *Seseli libanotis* subsp. *libanotis*, a najniži kod vrste *Tordylium maximum* (**Grafik 4.3.1**).

**Grafik 4.3.1.** Smanjenje apsorpcije DPPH za MeOH ekstrakt (*Seseli libanotis* subsp. *libanotis* i *Tordylium maximum*).



Gledano u okviru roda *Peucedanum*, najjači efekat je zabeležen kod vrste *P. officinale*, dok najslabiju aktivnost poseduje vrsta *P. longifolium*. U okviru roda *Seseli*, najbolja antioksidativna aktivnost kako u okviru roda tako i u okviru svih ispitivanih ekstrakata, zapažena je kod vrste *S. libanotis* subsp. *libanotis*, dok je najslabija aktivnost zabeležena kod vrste *S. pallasii*. Kod vrste *Cachrys cristata* analiziran je nadzemni deo i plod i utvrđeno je da plod ima bolju aktivnost u odnosu na nadzemni deo, dok je kod vrste *Opopanax hispidus* ispitivan nadzemni deo, cvast i plod i pokazano je da cvast ima najjači antioksidativni efekat. Vrste *Eryngium serbicum* i *Heracleum sphondylium* poseduju slične antioksidativne kapacitete. Za vrstu *Pastinaca sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu metanolnog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost. Antioksidativna aktivnost ekstrakata je najverovatnije uslovljena sadržajem polifenola (Tepe i sar., 2005; Lopez, 2007).

**Tabela 4.3.1.** Smanjenje apsorpcije DPPH u prisustvu metanolnih ekstrakata analiziranih biljnih vrsta.

	Konc. µg/ml	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	(A <sub>0</sub> -A <sub>1</sub> /A <sub>0</sub> ) *100	EC <sub>50</sub> mg/ml
<i>P. officinale</i>	31	1.076	1.056	1.86	<b>0.470</b>
	63.3	1.076	1.046	2.90	
	125	1.076	0.996	7.40	
	250	1.076	0.892	17.10	
	500	1.076	0.448	58.40	
	800	1.076	0.129	88.01	
<i>P. longifolium</i>	500	1.022	0.968	5.30	<b>4.068</b>
	1000	1.022	0.885	13.4	
	2000	1.022	0.774	24.2	
	5000	1.022	0.392	61.6	
	6000	1.022	0.278	72.7	
<i>P. aegopodioides</i>	65	1.512	1.505	0.46	<b>1.174</b>
	125	1.512	1.468	2.90	
	250	1.512	1.376	9.00	
	500	1.512	1.208	20.10	
	800	1.512	0.996	34.13	
	1000	1.512	0.884	41.50	
<i>P. alsaticum</i>	63.3	1.076	1.05	2.50	<b>0.947</b>
	125	1.076	1.032	4.09	
	250	1.076	0.894	16.90	
	800	1.076	0.637	40.80	
	1000	1.076	0.502	53.30	
<i>S. pallasii</i>	500	1.459	1.344	7.90	<b>4.633</b>
	800	1.459	1.301	10.80	
	1000	1.459	1.271	12.90	
	2000	0.999	0.736	26.02	
	5000	0.999	0.453	54.60	
	6000	0.999	0.357	62.70	
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	125	0.865	0.746	13.75	<b>0.460</b>
	250	0.865	0.614	29.02	
	500	0.865	0.334	61.40	
	800	0.865	0.093	89.25	
	1000	0.865	0.074	91.44	
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (nadmerni deo)	250	1.162	1.098	5.50	<b>3.014</b>
	500	1.162	0.984	15.30	
	2000	1.018	0.667	34.40	

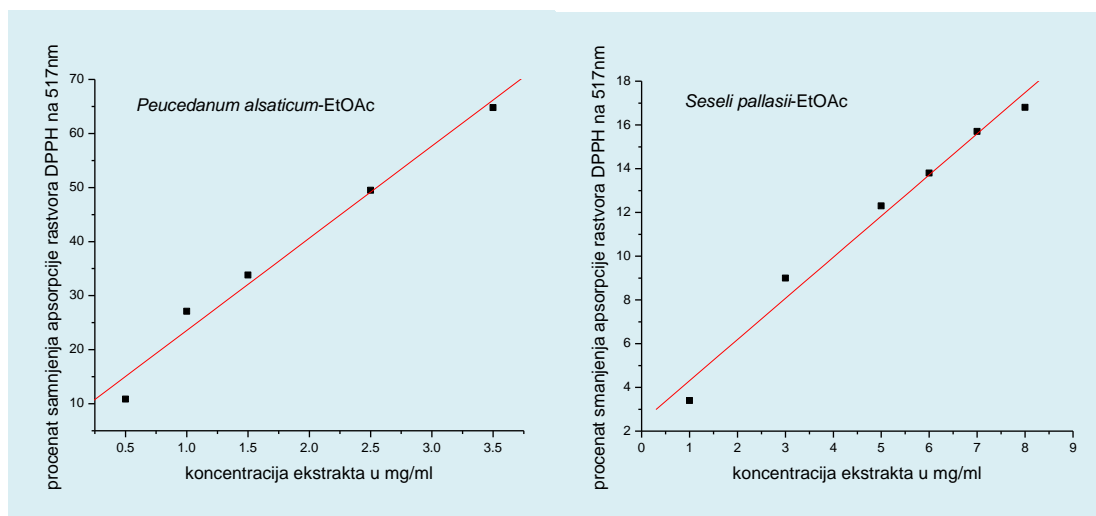


	3000	1.018	0.512	49.70	
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	500	1.146	1.061	7.42	
	800	1.146	0.997	13.00	<b>4.443</b>
	1000	1.146	0.965	15.80	
	2000	1.021	0.806	21.05	
	5000	1.021	0.451	55.80	
	6000	1.021	0.336	67.09	
<i>C. cristata</i> (nadzemni deo)	1000	1.137	0.959	15.60	
	1500	1.137	0.904	20.50	<b>4.058</b>
	2000	1.018	0.757	25.60	
	3000	1.018	0.597	41.30	
	5000	1.018	0.413	59.40	
<i>C. cristata</i> (plod)	125	1.073	1.056	1.58	
	250	1.073	1.032	3.90	<b>3.347</b>
	500	1.073	0.965	10.06	
	800	1.073	0.916	14.63	
	1000	1.073	0.868	19.10	
	2000	1.073	0.706	34.20	
	3000	1.262	0.734	41.80	
<i>O. hispidus</i> (nadzemni deo)	800	1.108	0.97	12.45	
	1000	1.108	0.938	15.35	<b>4.280</b>
	2000	1.132	0.834	26.30	
	5000	1.132	0.47	58.40	
	6000	1.132	0.367	67.50	
<i>O. hispidus</i> (cvast)	125	1.145	1.099	4.02	
	250	1.145	1.02	10.92	<b>1.157</b>
	500	1.145	0.925	20.00	
	800	1.145	0.756	33.97	
	1000	1.145	0.647	43.49	
<i>O. hispidus</i> (plod)	125	1.154	1.133	1.80	
	250	1.154	1.103	4.42	<b>2.661</b>
	500	1.154	1.032	10.57	
	800	1.154	0.96	16.81	
	1000	1.154	0.925	19.84	
	2000	1.154	0.729	36.80	
<i>E. serbicum</i>	500	1.099	0.938	14.60	
	800	1.099	0.83	24.50	<b>2.062</b>
	1000	1.099	0.771	29.80	
	2000	1.099	0.574	47.70	
<i>H. sphondylium</i>	500	1.212	1.118	7.75	
	800	1.212	1.077	11.14	<b>2.504</b>

	1000	1.212	1.021	15.76	
	2000	1.212	0.782	35.40	
	3000	1.212	0.444	63.30	
<i>T. maximum</i>	1000	1.262	1.174	6.90	
	3500	1.262	0.939	25.50	<b>7.825</b>
	5500	1.262	0.822	34.80	
	7500	1.262	0.659	47.78	

Smanjenje apsorpcije DPPH u prisustvu etil-acetatnih ekstrakata predstavljeno je u **Tabeli 4.3.2**. Prema dobijenim rezultatima može se uočiti da su EtOAc ekstrakti bili najslabiji u odnosu na aktivnost ostalih ekstrakata. Njihova  $EC_{50}$  se kretala od 2.550 mg/ml za *Peucedanum alsaticum* do 25.276 mg/ml rastvora za *Seseli pallasii* (**Grafik 4.3.2**).

**Grafik 4.3.2.** Smanjenje apsorpcije DPPH za EtOAc ekstrakt (*Peucedanum alsaticum* i *Seseli pallasii*).



U okviru roda *Peucedanum*, najjači efekat je zabeležen kod vrste *P. alsaticum*, što je ujedno i najbolja aktivnost u odnosu na sve ostale ekstrakte, dok najslabiju aktivnost poseduje vrsta *P. longifolium*. Zbog intenzivne boje koju je imao rastvor etil-acetatnog ekstrakta *P. officinale* ni u najnižim koncentracijama nije bilo moguće izmeriti DPPH vrednost. U okviru roda *Seseli*, samo za vrste *S. pallasii* i *S. libanotis* subsp. *libanotis*, je bilo moguće odrediti  $EC_{50}$ , dok za plod i nadzemni deo vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije bilo dovoljne količine ekstrakta. Kod vrste *C. cristata* analiziran je nadzemni deo i plod i utvrđeno je da nadzemni deo ima bolju aktivnost u odnosu na plod, dok je kod vrste *O. hispidus* ispitivan nadzemni deo, cvast i plod i pokazano je da cvast ima najjači antioksidativni efekat. Vrste *E. serbicum* i *H. sphondylium* poseduju jako slab antioksidativni kapacitet. Etil-acetatni ekstrakt vrste *T. maximum* je takođe pokazivao preveliku  $EC_{50}$  vrednost, tako da njegova vrednost nije uzeta u razmatranje. Za vrstu *P.*

*sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu metanolnog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost. Etil-acetat je rastvarač sa manjom polarnošću (najniža dielektrična konstanta) u odnosu na vodu, metanol i aceton što potvrđuju i rezultati da ovi ekstrakti nisu imali značajniji efekat u smanjenju apsorpcije.

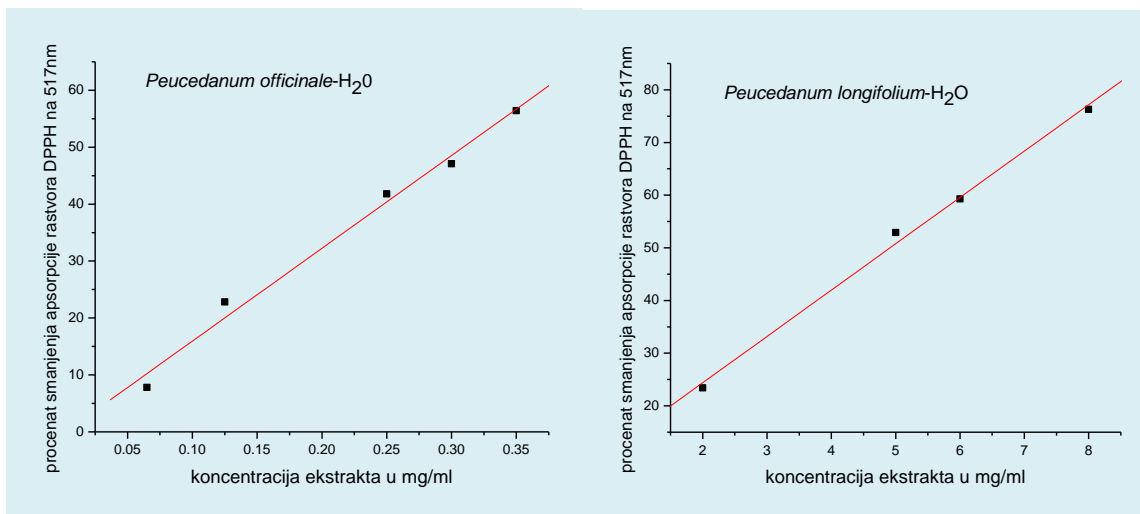
**Tabela 4.3.2.** Smanjenje apsorpcije DPPH u prisustvu etil-acetatnih ekstrakata analiziranih biljnih vrsta.

	Konc. μg/ml	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	(A <sub>0</sub> -A <sub>1</sub> /A <sub>0</sub> ) *100	EC <sub>50</sub> mg/ml
<i>P. officinale</i>	—	—	—	—	—
<i>P. longifolium</i>	500	1.032	0.994	3.68	<b>14.804</b>
	1000	1.032	0.945	8.40	
	1500	1.032	0.922	10.65	
	2000	1.032	0.899	12.88	
	3000	1.032	0.875	15.20	
	5000	1.032	0.825	20.05	
	6000	1.032	0.802	22.28	
<i>P. aegopodioides</i>	500	0.997	0.894	10.33	<b>4.942</b>
	1000	0.997	0.83	16.70	
	1500	0.997	0.774	22.36	
	2000	0.997	0.704	29.38	
	3000	0.997	0.649	34.90	
	5000	0.997	0.512	48.60	
<i>P. alsaticum</i>	500	1.177	1.049	10.87	<b>2.550</b>
	1000	1.121	0.817	27.10	
	1500	1.177	0.779	33.80	
	2500	1.177	0.592	49.70	
	3500	1.121	0.394	64.80	
<i>S. pallasii</i>	1000	1.144	1.105	3.40	<b>25.276</b>
	3000	1.144	1.041	9.00	
	5000	1.144	1.003	12.30	
	6000	1.144	0.986	13.80	
	7000	1.144	0.964	15.73	
	8000	1.144	0.952	16.80	
	9000	1.144	0.912	20.27	
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	500	1.137	1.097	3.50	<b>13.640</b>
	1000	1.137	1.048	7.80	
	1500	1.137	1.025	9.85	

	2000	1.137	0.994	12.57	
	3000	1.137	0.957	15.80	
	5000	1.137	0.887	21.98	
	6000	1.137	0.55	24.80	
	9000	1.137	0.78	33.30	
<i>C. cristata</i> (nadzemni deo)	2000	1.103	0.926	16.04	
	5000	1.103	0.77	30.19	<b>9.743</b>
	6000	1.103	0.714	35.26	
	8000	1.103	0.629	42.90	
	9000	1.103	0.599	45.60	
<i>C. cristata</i> (plod)	2000	1.138	1.037	8.87	
	5000	1.138	0.936	17.75	<b>17.621</b>
	6000	1.138	0.905	20.47	
	8000	1.138	0.859	24.50	
	9000	1.138	0.826	27.40	
<i>O. hispidus</i> (nadzemni deo)	2000	1.313	1.009	23.15	
	5000	1.313	0.794	39.52	<b>7.284</b>
	8000	1.313	0.612	53.38	
	9000	1.313	0.548	58.26	
<i>O. hispidus</i> (cvast)	500	1.39	1.169	15.80	
	1000	1.39	1.079	22.37	<b>3.167</b>
	2000	0.981	0.609	37.90	
	5000	0.981	0.274	72.06	
<i>O. hispidus</i> (plod)	1000	1.213	0.999	17.60	
	2000	1.213	0.868	28.44	<b>5.011</b>
	5000	1.213	0.6	50.53	
	6000	1.213	0.524	56.80	
<i>E. serbicum</i>	500	1.02	0.968	5.09	
	1000	1.02	0.929	8.90	<b>10.376</b>
	1500	1.02	0.896	12.15	
	2000	1.02	0.872	14.50	
	3000	1.02	0.839	17.70	
	5000	1.02	0.777	23.80	
	6000	1.02	0.69	32.35	
<i>H. sphondylium</i>	1000	1.248	1.21	3.04	
	1500	1.248	1.195	4.24	<b>24.164</b>
	3000	1.248	1.145	8.25	
	5000	1.248	1.09	12.66	
	6000	1.248	1.074	13.90	
<i>T. maximum</i>	–	–	–	–	–

Vodeni ekstrakti dobijeni iz suvog biljnog materijala postupkom liofilizacije testirani su DPPH metodom. Prema rezultatima iz **Tabele 4.3.3.** može se zapaziti da su vrednosti antioksidativnog potencijala u intervalu od 0.309-4.912 mg/ml rastvora. Najbolja aktivnost postignuta je kod vrste *P. officinale*, dok najslabiju aktivnost pokazuje vrsta *P. longifolium*, kako u okviru roda *Peucedanum* tako i u odnosu na sve ostale ekstrakte (**Grafik 4.3.3**). U okviru roda *Seseli*, najbolja antioksidativna aktivnost zabeležena je kod vrste *S. libanotis* subsp. *libanotis*, dok je najslabija aktivnost zabeležena kod vrste *S. pallasii*. Vodeni ekstrakt nadzemnog dela *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije ispitivan usled nedostatka biljnog materijala. Kod vrste *C. cristata* analiziran je samo plod, dok je kod vrste *O. hispidus* ispitivan nadzemni deo. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu metanolnog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost. EC<sub>50</sub> za *E. serbicum* je bila 1.247 mg/ml, *H. spondylium* 3.759 mg/ml, dok je EC<sub>50</sub> za *T. maximum* 4.043 mg/ml.

**Grafik 4.3.3.** Smanjenje apsorpcije DPPH za vodene ekstrakte vrsta *Peucedanum officinale* i *P. longifolium*).



**Tabela 4.3.3.** Smanjenje apsorpcije DPPH u prisustvu vodenih ekstrakata analiziranih biljnih vrsta.

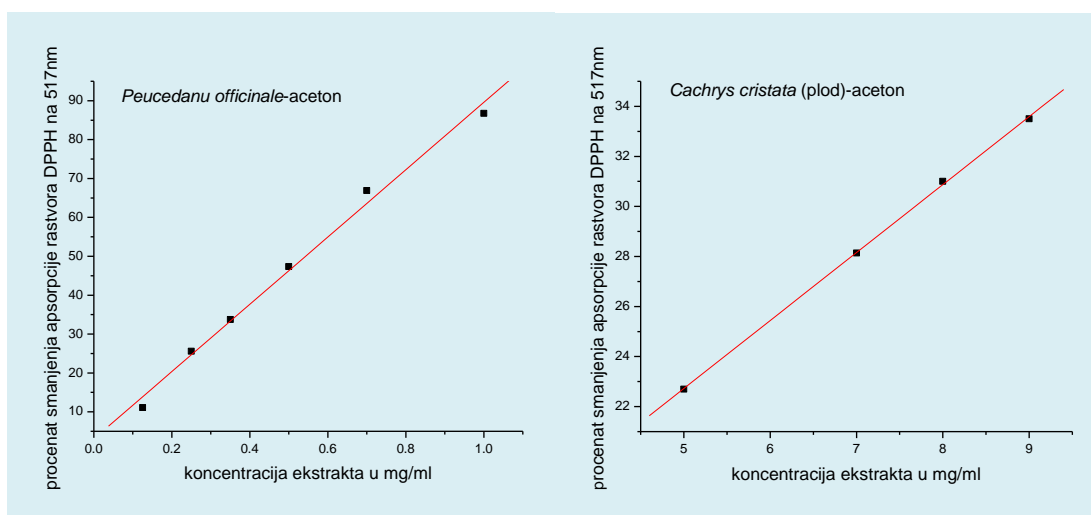
	Konc. µg/ml	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	(A <sub>0</sub> -A <sub>1</sub> /A <sub>0</sub> ) *100	EC <sub>50</sub> mg/ml
<i>P. officinale</i>	65	1.115	1.028	7.80	<b>0.309</b>
	125	1.115	0.86	22.80	
	250	1.115	0.648	41.80	
	300	1.115	0.59	47.08	
	350	1.115	0.49	56.40	
<i>P. longifolium</i>	2000	1.388	1.063	23.41	<b>4.912</b>
	5000	1.388	0.653	52.90	
	6000	1.388	0.565	59.29	
	8000	1.388	0.329	76.29	
<i>P. aegopodioides</i>	250	1.487	1.314	11.60	<b>1.360</b>
	500	1.487	1.135	23.67	
	700	1.487	1.049	29.40	
	1000	1.487	0.896	39.74	
	1500	1.487	0.67	54.90	
	2000	1.487	0.455	69.40	
<i>P. alsaticum</i>	250	1.354	1.1	18.21	<b>0.613</b>
	500	1.354	0.763	43.64	
	700	1.354	0.545	59.74	
	1000	1.354	0.293	78.36	
<i>S. pallasii</i>	500	1.012	0.943	6.81	<b>4.268</b>
	800	1.012	0.907	10.37	
	1000	1.012	0.87	14.03	
	2000	1.012	0.758	25.09	
	3000	1.012	0.626	38.14	
	4000	1.012	0.52	48.61	
	5000	1.012	0.45	55.53	
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	125	1.016	0.857	15.67	<b>0.492</b>
	250	1.016	0.742	26.90	
	350	1.016	0.613	39.66	
	500	1.016	0.507	50.09	
	600	1.016	0.4	60.62	
	700	1.016	0.325	68.01	
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	500	1.062	0.847	20.24	

	700	1.062	0.776	26.90	<b>1.500</b>
	1000	1.062	0.67	36.91	
	1500	1.062	0.52	51.03	
	2000	1.062	0.39	63.27	
<hr/>					
<i>C. cristata</i> (plod)	500	1.069	0.916	14.31	
	700	1.069	0.821	23.19	<b>1.784</b>
	1000	1.069	0.765	28.43	
	1500	1.069	0.59	44.80	
	2000	1.069	0.462	56.78	
	2500	1.069	0.354	66.88	
<hr/>					
<i>O. hispidus</i> (nadzemni deo)	800	1.108	0.97	12.45	
	1000	1.108	0.938	15.35	<b>4.280</b>
	2000	1.132	0.834	26.30	
	5000	1.132	0.47	58.40	
	6000	1.132	0.367	67.50	
<hr/>					
<i>E. serbicum</i>	350	1.052	0.836	20.50	
	500	1.052	0.798	24.14	<b>1.247</b>
	700	1.052	0.731	30.51	
	1000	1.052	0.592	43.70	
	1500	1.052	0.422	59.88	
	2000	1.052	0.278	73.57	
<hr/>					
<i>H. sphondylium</i>	700	1.549	1.36	12.20	
	1000	1.549	1.292	16.59	<b>3.759</b>
	1500	1.549	1.161	25.05	
	2000	1.549	1.076	30.53	
	3000	1.549	0.875	43.51	
	4000	1.549	0.771	50.22	
	5000	1.549	0.547	64.68	
<hr/>					
<i>T. maximum</i>	1000	1.057	0.875	17.21	
	1500	1.057	0.784	25.80	<b>4.043</b>
	2000	1.057	0.741	29.89	
	3000	1.057	0.61	42.51	
	4000	1.057	0.522	50.61	
	5000	1.057	0.453	57.14	



Antioksidativna aktivnost acetonskih ekstrakata koji su dobijeni iz suvog biljnog materijala analiziranih vrsta se kretala u opsegu od 0.543 do 15.043 mg/ml rastvora. Najjači efekat je zapažen kod acetonskog ekstrakta vrste *P. officinale*, a najniži kod ekstrakta ploda vrste *C. cristata* (Tabela. 4.3.4, Grafik 4.3.4). Gledano u okviru roda *Peucedanum*, najjači efekat je zabeležen kod vrste *P. officinale*, koji ujedno ima i najbolju aktivnost u odnosu na sve ekstrakte, dok najslabiju aktivnost poseduje vrsta *P. longifolium*. U okviru roda *Seseli*, najbolja antioksidativna aktivnost zapažena je kod vrste *S. libanotis* subsp. *libanotis*, dok je najslabija aktivnost zabeležena u ekstraktu ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium*. Nadzemni deo vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije ispitivan usled nedostatka biljnog materijala. Kod vrste *C. cristata* analiziran je nadzemni deo i plod i utvrđeno je da plod ima najslabiju aktivnost u odnosu na sve ispitivane ekstrakte, dok je kod vrste *O. hispidus* ispitivan samo nadzemni deo, zbog nedostatka materijala. EC<sub>50</sub> za *E. serbicum* je bila 1.838 mg/ml, dok je za vrstu *H. sphondylium* 3.518 mg/ml. Za vrste *T. maximum* i *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu acetonskih ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njihova aktivnost.

**Grafik 4.3.4.** Smanjenje apsorpcije DPPH za acetonске ekstrakte vrsta *Peucedanum officinale* i *Cachrys cristata*.



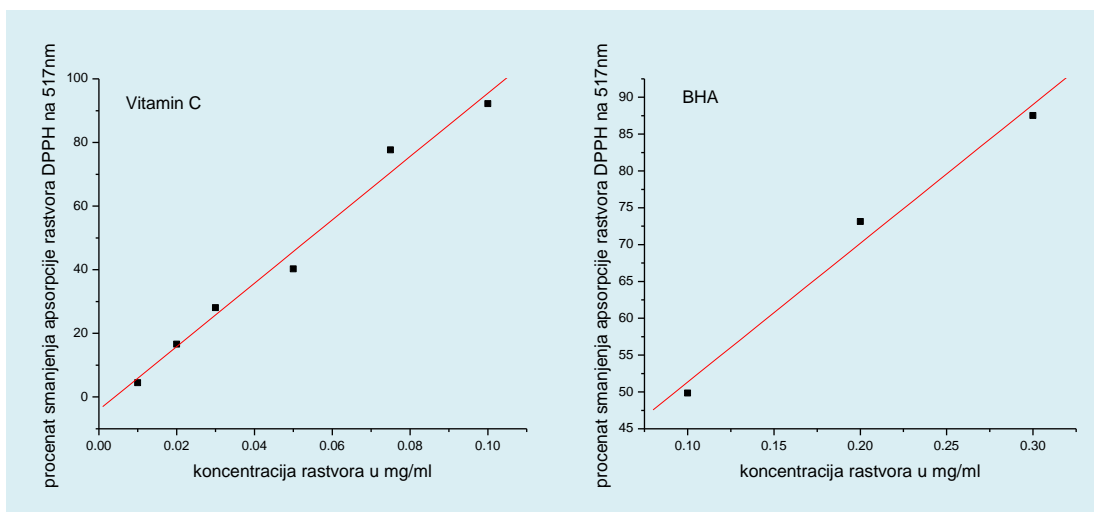
**Tabela 4.3.4.** Smanjenje apsorpcije DPPH u prisustvu acetonskih ekstrakata analiziranih biljnih vrsta.

	Konc. µg/ml	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	(A <sub>0</sub> -A <sub>1</sub> / A <sub>0</sub> ) *100	EC <sub>50</sub> mg/ml
<i>P. officinale</i>	125	1.206	1.072	11.10	<b>0.543</b>
	250	1.206	0.897	25.60	
	350	1.206	0.799	33.74	
	500	1.206	0.635	47.34	
	700	1.206	0.399	66.90	
	1000	1.206	0.16	86.73	
<i>P. longifolium</i>	2000	1.065	0.9	15.49	<b>11.057</b>
	3500	1.065	0.83	22.06	
	5000	1.065	0.783	26.47	
	6500	1.065	0.723	32.11	
	8500	1.065	0.65	38.96	
	9500	1.065	0.58	45.53	
<i>P. aegopodioides</i>	500	1.337	0.984	26.40	<b>1.134</b>
	700	1.337	0.853	36.20	
	1000	1.337	0.7	47.60	
	2000	1.337	0.292	78.16	
<i>P. alsaticum</i>	250	1.076	0.932	13.38	<b>1.198</b>
	500	1.076	0.801	25.50	
	700	1.076	0.7	34.90	
	1000	1.076	0.575	46.50	
	1500	1.076	0.434	59.66	
	2000	1.076	0.253	76.48	
<i>S. pallasii</i>	3000	1.1	0.783	28.80	<b>7.138</b>
	5000	1.1	0.643	41.50	
	6500	1.1	0.565	48.63	
	8500	1.1	0.497	54.81	
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1000	1.12	0.892	20.35	<b>3.585</b>
	2000	1.12	0.732	34.64	
	3000	1.12	0.615	45.08	
	5000	1.12	0.402	64.10	
<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2000	1.134	1.029	9.20	<b>9.96</b>
	4000	1.134	0.899	20.70	

	6000	1.134	0.803	29.18	
	8000	1.134	0.701	38.10	
	9000	1.134	0.603	46.80	
<i>C. cristata (nadzemni deo)</i>	2000	1.148	0.927	19.25	
	4000	1.148	0.832	27.50	<b>9.605</b>
	5000	1.148	0.769	33.01	
	8000	1.297	0.726	44.02	
	9000	1.297	0.69	46.80	
<i>C. cristata (plod)</i>	5000	1.361	1.052	22.70	
	7000	1.361	0.978	28.14	<b>15.043</b>
	8000	1.361	0.939	31.00	
	9000	1.361	0.904	33.50	
<i>O. hispidus (nadzemni deo)</i>	1000	1.038	0.895	13.70	
	2000	1.038	0.793	23.60	<b>4.997</b>
	3000	1.038	0.692	33.30	
	4000	1.038	0.591	43.06	
	5000	1.038	0.506	51.25	
	6000	1.038	0.452	56.45	
<i>E. serbicum</i>	500	0.98	0.827	15.61	
	700	0.98	0.751	23.36	<b>1.838</b>
	1000	0.98	0.669	31.70	
	1500	0.98	0.562	42.65	
	2000	0.98	0.464	52.63	
<i>H. sphondylium</i>	1000	1.236	1.016	17.79	
	2000	1.236	0.825	33.25	<b>3.518</b>
	3000	1.236	0.674	45.46	
	4000	1.236	0.567	54.12	

Kao kontrola za utvrđivanje antioksidativne aktivnosti u paralelnim eksperimentima su korišćeni dobro poznati antioksidansi BHA (3-tert-butil-4-hidroksianizol) i vitamin C. Rezultati antioksidativne aktivnosti komercijalnih antioksidanasa se vide na **Grafiku 4.3.5**. Dobijene vrednosti na osnovu kalibracionih kriva  $EC_{50}$  0.093 mg/ml za BHA i 0.054 mg/ml za vitamin C. Vitamin C se pokazao kao jači antioksidans u odnosu na BHA.

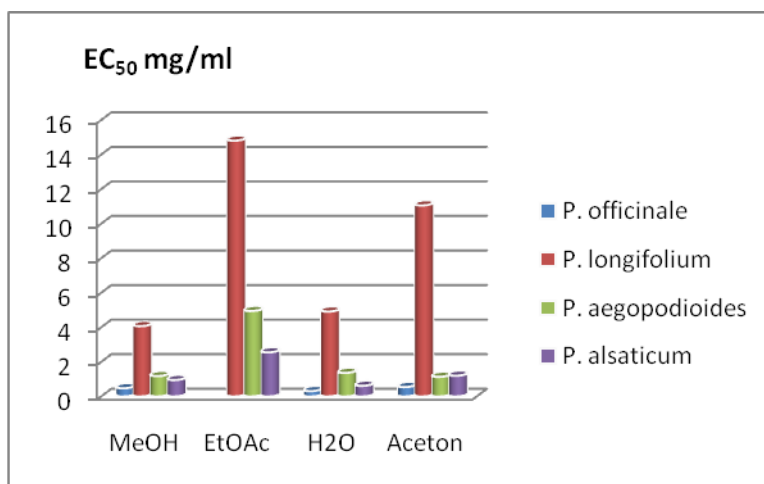
**Grafik 4.3.5.** Smanjenje apsorpcije DPPH za vitamin C i BHA.



Najjači antioksidativni kapacitet od svih testiranih uzoraka imao je vodeni ekstrakt biljne vrste *Peucedanum officinale* čija je  $EC_{50}$  vrednost iznosila 0.309 mg/ml (**Tabela 4.3.3**). Poređenje rezultata dobijenih u ovom radu sa radovima drugih autora nije bilo moguće ili je jako oskudno iz razloga što su ovakve analize na datim biljnim vrstama prvi put testirane.

Posmatrajući na nivou vrste, *P. officinale* ima najbolju antioksidativnu aktivnost (za ovu vrstu može da se kaže da ima i najbolju aktivnost u odnosu na ostale vrste), zatim *P. alsaticum* i *P. aegopodioides*, dok najslabiju antioksidativnu aktivnost poseduje *P. longifolium*. Vodeni, metanolni i acetonski ekstrakti pokazali su približno isti antioksidativni kapacitet, dok etil-acetatni ekstrakti znatno odstupaju sa svojim vrednostima (**Grafik 4.3.6**).

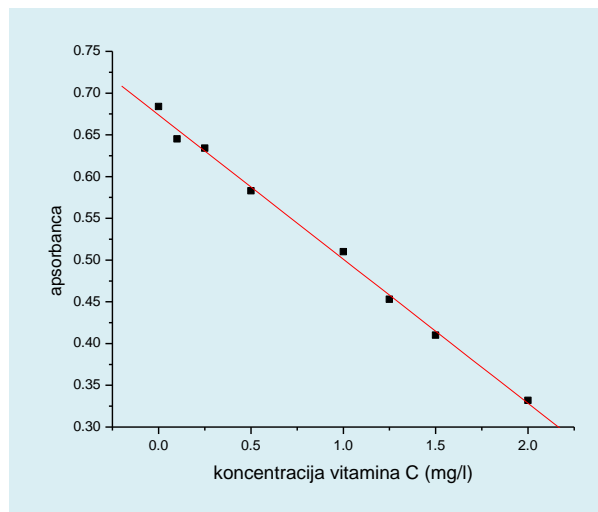
**Grafik 4.3.6.** Uporedni pregled antioksidativne aktivnosti vrta roda *Peucedanum* izražene preko  $EC_{50}$  (mg/ml).



### 4.3.2. ABTS test

U radu je pored DPPH metode, za utvrđivanje antioksidativne aktivnosti, korišćena i ABTS metoda. Obe metode su odgovorne za prikupljanje slobodnih radikala, jer su njihovi mehanizmi delovanja slični. ABTS se dobro rastvara kako u vodi tako i u organskim rastvaračima i reaguje relativno brzo. Kada biljke sadrže antocijanine DPPH metod nije dovoljno precizan, što nije slučaj sa ABTS testom, naročito kada se apsorpcija meri na 734 nm (Arnao, 2000). Antioksidativna aktivnost u uzorcima izražava se u ekvivalentima vitamina C (VitC, mg vitamina C po l) (**Grafik 4.3.7**) i dobija se tako što su koncentracije dobijene na osnovu kalibracione krive vitamina C pomnožene sa faktorom razblaženja.

**Grafik 4.3.7.** Kalibraciona kriva standarda vitamina C.



Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata koji su rađeni u ovom radu kreće se u opsegu od 1.87 do 3.35 mg VitC/l (**Tabela 4.3.5**). Najbolju antioksidativnu aktivnost, kako u okviru roda, tako i u odnosu na sve ekstrakte, poseduje metanolni ekstrakt vrste *Peucedanum officinale* (koncentracija ovog ekstrakta je 1 mg/ml), dok najslabiju aktivnost ima *P. aegopodioides* sa koncentracijom od 1 mg/ml. U okviru roda *Seseli*, najbolja antioksidativna aktivnost zabeležena je kod vrste *S. pallasii*, s tim što je koncentracija ovog

ekstrakta bila 3 mg/ml, dok je najslabiji bio ekstrakt vrste *S. libanotis* subsp. *libanotis* sa koncentracijom ekstrakta od 1 mg/ml. Nadzemni deo i plod vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* imali su skoro istu vrednost (oba ekstrakta su rađena sa koncentracijom od 2 mg/ml). Nadzemni deo vrste *Cachrys cristata* je pokazao bolju aktivnost u odnosu na plod ali je i rađen sa većom koncentracijom ekstrakta (od 3 mg/ml). Kod vrste *Opopanax hispidus*, najbolju antioksidativnu aktivnost ima metanolni ekstrakt cvasti, pri koncentraciji od 1.5 mg/ml, dok je najslabiji efekat ima ekstrakt nadzemnog dela. Vrste *Eryngium serbicum* i *Heracleum sphondylium* i u okviru ovog testa pokazuju skoro istu antioksidativnu vrednost (koncentracije oba ekstrakta bile su 2 mg/ml). Vrsta *Tordylium maximum* ima jako slabu antioksidativnu vrednost i iz tog razloga je koncentracija ovog ekstrakta bila 5 mg/ml. Za vrstu *Pastinaca sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu metanolnog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost.

Antioksidativna aktivnos etil-acetatnih ekstrakata kretala se u opsegu od 0.76 do 2.92 mg VitC/l (**Tabela 4.3.5**). Svi ekstrakti su rađeni sa koncentracijom od 5 mg/ml, jer generalno gledano etil-acetatni ekstrakti imaju najslabiji antioksidativni kapacitet u odnosu na sve ostale, što je i vezano za polarnost ovog rastvarača. Najbolja antioksidativna aktivnost, kako u okviru roda tako i u odnosu na ostale ekstrakte zabeležena je kod vrste *P. alsaticum*, dok najslabiju aktivnost ima *T. maximum*. Najslabiju aktivnost u okviru roda *Peucedanum* imala je vrsta *P. longifolium*, dok za vrstu *P. aegopodioides* nije bilo dovoljno etil-acetatnog ekstrakta za analizu. U okviru roda *Seseli* bolju antioksidativnu aktivnost imala je vrsta *S. libanotis* subsp. *libanotis* u odnosu na *S. pallasii*, dok za analizu nadzemnog dela i ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije bilo dovoljno ekstrakta. Nadzemni deo vrste *C. cristata* je pokazao bolju aktivnost u odnosu na plod. Kod vrste *O. hispidus* rezultati su pokazali da cvast ima bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na plod, dok za nadzemni deo nije bilo dovoljno ekstrakta za analizu. Vrste *E. serbicum* i *H. sphondylium* i u okviru ovog testa pokazuju slične antioksidativnu vrednost. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu etil-acetatnog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost.

Antioksidativna aktivnost vodenih ekstrakata koji su rađeni u ovom radu kreće se u opsegu od 2.15 do 3.36 mg VitC/l (**Tabela 4.3.5**). Najbolju antioksidativnu aktivnost

poseduje vodeni ekstrakt vrste *E. serbicum* (koncentracija ovog ekstrakta je 2 mg/ml), dok najslabiju aktivnost ima *P. longifolium* sa koncentracijom takođe od 2 mg/ml. Posmatrajući rod *Peucedanum*, najjača antioksidativna aktivnost zabeležena je kod vrste *P. officinale* (koncentracija ekstrakta od 1 mg/ml). U okviru roda *Seseli*, najbolja aktivnost zabeležena je u ekstraktu ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* (koncentracija ovog ekstrakta bila je 2 mg/ml), dok je najslabiji bio ekstrakt vrste *S. libanotis* subsp. *libanotis* sa koncentracijom ekstrakta od 1 mg/ml. Nadzemni deo *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije rađen usled nedostatka biljnog materijala. Ekstrakt nadzemnog dela vrste *O. hispidus* (koncentracija ekstrakta 3 mg/ml) ima slabiju antioksidativnu aktivnost od ekstrakta ploda vrste *C. cristata* (koncentracija ekstrakta 2 mg/ml). Za ostale analize u okviru ova dva roda nije bilo dovoljno materijala. Vrsta *H. sphondylium* (koncentracija ekstrakta bila je 2 mg/ml) ima mnogo bolju antioksidativnu aktivnost od vrste *T. maximu* sa koncentracijom ekstrakta od 3 mg/ml. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu vodenog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost.

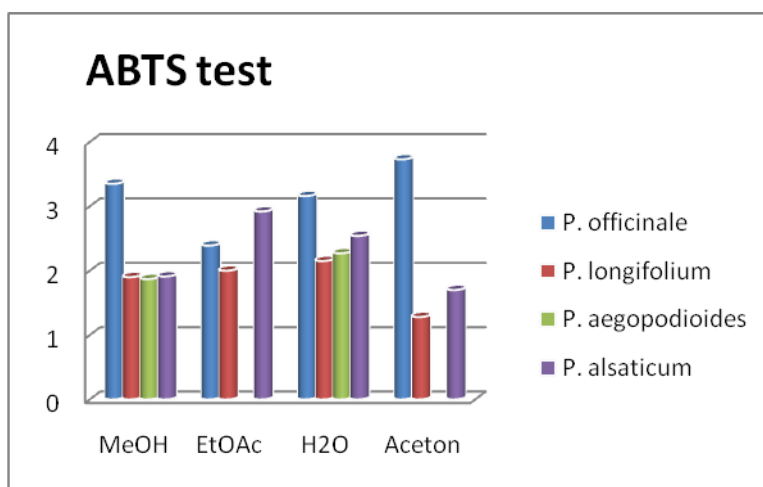
Za acetonske ekstrakte antioksidativna aktivnost kretala se u opsegu od 1.24 do 3.73 mg VitC/l (**Tabela 4.3.5**). Najbolju antioksidativnu aktivnost, gledano kako u okviru roda tako i u odnosu na sve ekstrakte, poseduje acetonski ekstrakt vrste *P. officinale* (koncentracija ovog ekstrakta je 1 mg/ml), dok najslabiju aktivnost ima *S. libanotis* subsp. *libanotis* sa koncentracijom takođe od 1 mg/ml. Posmatrajući rod *Peucedanum*, najslabija aktivnost zabeležena je kod vrste *P. longifolium* (koncentracija ekstrakta bila je 2 mg/ml). U okviru roda *Seseli*, najbolja antioksidativnu aktivnost poseduje ekstrakt ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* s tim što je koncentracija ovog ekstrakta bila 2 mg/ml. Za izradu ekstrakta nadzemnog dela ove biljke nije bilo dovoljno biljnog materijala. Nadzemni deo vrste *C. cristata* je pokazao bolju aktivnos u odnosu na plod, ali je i rađen sa većom koncentracijom ekstrakta od 3 mg/ml. Za vrstu *O. hispidus* nije bilo dovoljno ekstrakta za ovu analizu. Vrste *E. serbicum* i *H. sphondylium* i u okviru ovog testa pokazuju sličnu antioksidativnu vrednost (koncentracije oba ekstrakta bile su 2 mg/ml). Acetonski ekstrakt vrste *T. maximum* je bio u malom prinosu, tako da nije bilo dovoljno za ABTS test. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu acetonskog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost.



Kao kontrola za utvrđivanje antioksidativne aktivnosti u paralelnim eksperimentima je korišćen BHA (3-tert-butil-4-hidroksianizol). Rezultat antioksidativne aktivnosti komercijalnog antioksidanta je vrednosti dobijene na osnovu kalibracione krive i za BHA iznosi 2.66 mg VitC/l (za koncentraciju BHA uzeta je vrednost od 0.1 mg/ml).

Najjači antioksidativni kapacitet od svih testiranih uzoraka, korišćenjem ABTS testa, imao je acetonski ekstrakt biljne vrste *Peucedanum officinale* čija je vrednost iznosila 3.73 mg VitC/l (Tabela 4.3.5, Grafik 4.3.8). Poređenje rezultata dobijenih u ovom radu sa radovima drugih autora nije bilo moguće, jer su ovakve analize na datim biljnim vrstama prvi put rađene.

**Grafik 4.3.8.** Uporedni pregled antioksidativne aktivnosti (ABTS test) vrta roda *Peucedanum* izražene preko ekvivalenta vitamina C.



**Tabela 4.3.5.** Određivanje antioksidativne aktivnosti pomoću ABTS-a u metanolnim, etil-acetatnim, acetonskim i vodenim ekstraktima analiziranih biljnih vrsta.

		Konc. (mg/ml)	ABTS test (734nm)
<b>Metanolni ekstrakti</b>	<i>Peucedanum officinale</i>	1	3.35±0.012
	<i>P. longifolium</i>	2	1.90±0.004
	<i>P. aegopodioides</i>	1	1.87±0.016
	<i>P. alsaticum</i>	1	1.91±0.003
	<i>Seseli pallasii</i>	3	2.20±0.009
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1	1.94±0.019
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i>	2	2.04±0.006
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2	2.06±0.008
	<i>Cachrys cristata</i>	3	2.75±0.016
	<i>C. cristata</i> (plod)	2	2.23±0.023
	<i>Opopanax hispidus</i>	3	2.15±0.016
	<i>O. hispidus</i> (cvast)	1.5	3.14±0.006
	<i>O. hispidus</i> (plod)	2	2.63±0.015
	<i>Eryngium serbicum</i>	2	2.34±0.023
	<i>Heracleum sphondylium</i>	2	2.35±0.007
<i>Tordylium maximum</i>	5	2.48±0.010	
<b>Etil-acetatni ekstrakti</b>	<i>P. officinale</i>	5	2.39±0.003
	<i>P. longifolium</i>	5	2.00±0.009
	<i>P. alsaticum</i>	5	2.92±0.016
	<i>S. pallasii</i>	5	0.83±0.011
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	5	1.20±0.016
	<i>C. cristata</i>	5	1.91±0.004
	<i>C. cristata</i> (plod)	5	1.01±0.017
	<i>O. hispidus</i> (cvast)	5	2.90±0.004
	<i>O. hispidus</i> (plod)	5	1.78±0.005
	<i>E. serbicum</i>	5	1.63±0.006
	<i>H. sphondylium</i>	5	1.16±0.001
	<i>T. maximum</i>	5	0.76±0.001
<b>Vodeni ekstrakti</b>	<i>P. officinale</i>	1	3.16±0.000
	<i>P. longifolium</i>	2	2.15±0.001
	<i>P. aegopodioides</i>	1	2.27±0.013
	<i>P. alsaticum</i>	1	2.54±0.003

	<i>S. pallasii</i>	3	2.71±0.038
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1	2.51±0.031
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2	3.14±0.013
	<i>C. cristata</i> (plod)	2	2.75±0.011
	<i>O. hispidus</i>	3	2.37±0.017
	<i>E. serbicum</i>	2	3.36±0.007
	<i>H. sphondylium</i>	2	3.13±0.000
	<i>T. maximum</i>	3	2.78±0.010
<b>Acetonski ekstrakti</b>	<i>P. officinale</i>	1	3.73±0.005
	<i>P. longifolium</i>	2	1.28±0.011
	<i>P. alsaticum</i>	1	1.70±0.024
	<i>S. pallasii</i>	3	2.23±0.024
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1	1.24±0.002
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2	2.34±0.020
	<i>C. cristata</i>	3	3.42±0.005
	<i>C. cristata</i> (plod)	2	2.30±0.003
	<i>E. serbicum</i>	2	2.44±0.011
	<i>H. sphondylium</i>	2	2.92±0.007
<b>BHA</b>		0.1	2.66±0.005
<b>Vitamin C</b>		0.1	–

Za sve vrednosti u tabeli računata je srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija.

### 4.3.3. Određivanje sadržaja polifenola

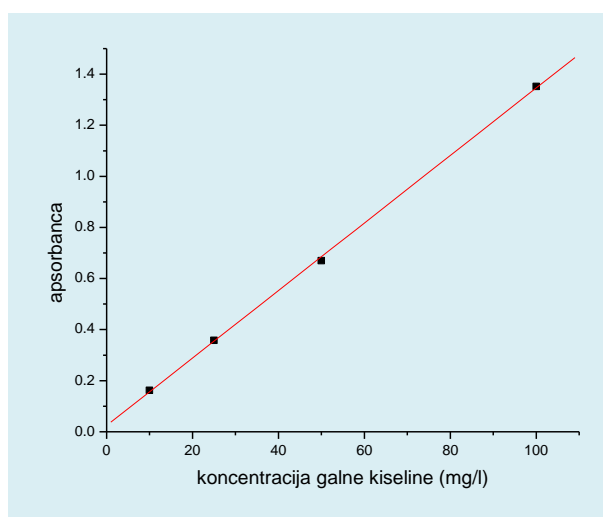
Polifenoli pripadaju višoj klasi sekundarnih metabolita. Najčešće se rastvaraju u vodi i zato se često javljaju u kombinaciji kao glikozidi i obično su smešteni u ćelijskoj vakuoli. Polifenoli su antioksidansi sa redoks sposobnostima, koje im omogućavaju da se ponašaju kao redukovajući agensi, donori vodonika i hvatači slobodnog kiseonika. Takođe, poseduju metal helirajuće sposobnosti (Proestos i sar., 2005). U novije vreme se preporučuje korišćenje ovih supstanci kao potencijalnih konzervanasa, kako bi se redukovala upotreba sintetičkih antioksidanasa (Proestos i sar., 2005). Polifenolna jedinjenja su nađena u mnogim biljkama, ali njihova koncentracija i hemijske forme zavise od biljnog izvora. Najzastupljenije polifenolne grupe su fenolne kiseline i flavonoidi uključujući flavonole, flavon-3-ole, flavanone, flavone, antocijanidine, izoflavone i derivate stilbena. Fenolne kiseline koje se javljaju u različitom voću i povrću sadrže hidroksicinaminske kiseline (na primer, *p*-kumarinsku, ferulinsku i kafeinsku kiselinu). One se vezuju za druga jedinjenja (na primer kininsku ili *cis*-tatarinsku kiselinu) gradeći različite grupe derivata, od kojih su najproučavanije hlorogenske kiseline (Pepetti i sar., 2008). Tečna hromatografija-masena spektromertija (LC-MS) je savremena metoda za kvalitativnu identifikaciju polifenolnih jedinjenja. Ova metoda je korišćena za identifikaciju fenolnih kiselina iz različitih izvora (hrane, kafe, jagoda, suvih šljiva i voćnih sokova) (Pepetti i sar., 2008).

Derivati kafeinske kiseline poseduju antioksidativna, antimutagena, antiinflamatorna, antimikrobna i hepatoprotektivna svojstva. Ruzmarinska kiselina poseduje antiviralnu, antibakterijsku, antioksidativnu, antiinflamatornu i imunostimulirajuću aktivnost (Zgórka i Głowniak, 2001). Takođe, ona poseduje i antitrombinska, antialergijska, antiviralna svojstva protiv herpes simpleks virusa i HIV-a, koristi se i u kozmetičkim preparatima protiv bora (Lu i Foo, 2001; Lu i Foo, 2002; Fecka i Turek, 2008).

Analiza ukupnih fenolnih jedinjenja pomoću Folin-Ciocalteu reagensa je najčešće korišćena metoda za merenje sadržaja polifenola u biljnom materijalu (Singleton i Rossi, 1965). Ova analiza je bazirana na reakciji transfera elektrona i zapravo meri redukujući

kapacitet uzoraka (Prior i sar., 2005; Huang i sar., 2005). U novije vreme se koristi kao rutinska metoda za grubu procenu antioksidativnog kapaciteta uzoraka hrane (Roginsky i Lissi, 2005). Folinov reagens sa polifenolima u blago baznoj sredini (natrijum-hidrogenkarbonat) daje kompleks tamno plave boje čija se apsorbancija meri na spektrofotometru na talasnoj dužini 740 nm. Koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima izražava se u ekvivalentima galne kiseline (GAE, mg galne kiseline po l) (**Grafik 4.3.9**) i dobija se tako što su koncentracije dobijene na osnovu kalibracione krive galne kiseline pomnožene sa faktorom razblaženja.

**Grafik 4.3.9.** Kalibraciona kriva standarda galne kiseline.



Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da se ukupna količina polifenola u metanolnim ekstraktima kretala u opsegu od 52.18 do 100.61 mg GAE/l. Najveća zastupljenost polifenola, kako u okviru roda tako i u odnosu na sve ekstrakte, je u metanolnom ekstraktu *Peucedanum officinale*, a najmanja u ekstraktu vrste *P. aegopodioides* (**Tabela 4.3.6**). U okviru roda *Seseli*, najveću količinu fenola sadrži ekstrakt nadzemnog dela vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* s tim što je koncentracija ovog ekstrakta bila 2 mg/ml, dok je najslabiji bio ekstrakt ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* sa koncentracijom ekstrakta takođe od 2 mg/ml. Nadzemni deo vrste *Cachrys cristata* je pokazao veću količinu fenola u odnosu na plod, ali je i rađen sa većom koncentracijom ekstrakta od 3 mg/ml. Kod vrste *Opopanax hispidus*, rezultati su pokazali

da bez obzira na to što je cvast rađena sa najmanjom koncentracijom od 1.5 mg/ml ima najveću količinu fenola, dok nadzemni deo (koncentracija ovog ekstrakta je najveća i iznosi 3 mg/ml) poseduje najslabiju aktivnost. Vrste *Eryngium serbicum* i *Heracleum sphondylium* i u okviru ovog testa pokazuju približne vrednosti za polifenole (koncentracije oba ekstrakta bile su 2 mg/ml). Vrsta *Tordylium maximum* ima jako slabu antioksidativnu vrednost i iz tog razloga je koncentracija ovog ekstrakta bila 5 mg/ml, analogno tome sadrži i malu količinu polifenola. Za vrstu *Pastinaca sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu metanolnog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana ukupna količina fenola. Većina dobijenih rezultata za fenole se u potpunosti poklapaju sa rezultatima dobijenim za antioksidativnu aktivnost koristeći ABTS test. Iz ovoga možemo zaključiti da antioksidativna aktivnost direktno zavisi od sadržaja polifenola.

U okviru etil-acetatnih ekstrakata sadržaj polifenola se kretao u opsegu od 22.60 do 99.78 mg GAE/l (**Tabela 4.3.6**). Svi ekstrakti su rađeni sa koncentracijom od 5 mg/ml, jer generalno gledano etil-acetatni ekstrakti imaju najslabiji antioksidativni kapacitet, pa tako i najmanju količinu polifenola. Najveća količina fenola, kako u okviru roda tako i u odnosu na ostale ekstrakte, zabeležena je kod vrste *P. alsaticum*, dok najmanje fenola poseduje ekstrakt ploda *C. cristata*. Najmanju količinu fenola u okviru roda *Peucedanum* imala je vrsta *P. longifolium*, dok za vrstu *P. aegopodioides* nije bilo dovoljno etil-acetatnog ekstrakta za analizu. U okviru roda *Seseli*, veću količinu fenola imala je vrste *S. libanotis* subsp. *libanotis* u odnosu na *S. pallasii*, dok za analizu nadzemni deli i ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije bilo dovoljno ekstrakta. Nadzemni deo vrste *C. cristata* je pokazao veću količinu fenola u odnosu na plod. Kod vrste *O. hispidus*, rezultati su pokazali da cvast ima najveću količinu polifenola u odnosu na plod i nadzemni deo. Vrsta *E. serbicum* je imala veću količinu fenola u odnosu na ekstrakt vrste *H. sphondylium*. Određivanje fenola za ekstrakt biljne vrste *T. maximum* nije bilo moguće. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu etil-acetatnog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost. Gledajući rezultate dobijene za fenole etil-acetatnih ekstrakata, takođe postoji veliko poklapanje sa ABTS testom.

Količina ukupnih fenola vodenih ekstrakata koji su rađeni u ovom radu kreće se u opsegu od 52.49 do 99.33 mg GAE/l (**Tabela 4.3.6**). Najviše fenola zabeleženo je u plodu

vodenog ekstrakta vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* (koncentracija ovog ekstrakta je 2 mg/ml), dok najmanje fenola poseduje *P. longifolium* sa koncentracijom takođe od 2 mg/ml. Posmatrajući rod *Peucedanum*, najveća količina fenola prisutna je kod vrste *P. officinale* (koncentracija ekstrakta od 1 mg/ml). U okviru roda *Seseli* najmanje fenola detektovano je u ekstraktu vrste *S. libanotis* subsp. *libanotis* sa koncentracijom ekstrakta od 1 mg/ml. Nadzemni deo *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije rađen usled nedostatka biljnog materijala. Ekstrak nadzemnog dela vrste *O. hispidus* (koncentracija ekstrakta 3 mg/ml) ima manju količinu fenola od ekstrakta ploda vrste *C. cristata* (koncentracija ekstrakta 2 mg/ml). Za ostale analize u okviru ova dva roda nije bilo dovoljno materijala. Vrste *E. serbicum* i *H. sphondylium* i u okviru ovog testa imaju sličnu količinu fenola (koncentracije oba ekstrakta bile su 2 mg/ml). Vodeni ekstrakt vrste *T. maximum* sa koncentracijom od 3 mg/ml pokazuje relativno nisku količinu fenola. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu vodenog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost. Količina ukupnih fenola i kod vodenih ekstrakata je u priličnoj korelaciji sa vrednostima dobijenim ABTS testom.

Za acetonske ekstrakte količina ukupnih fenola kretala se u opsegu od 56.72 do 166.97 mg GAE/l (**Tabela 4.3.6**). Najveća količina fenola zabeležena je u ekstraktu nadzemnog dela vrste *C. cristata* (koncentracija ovog ekstrakta je 3 mg/ml), dok najmanju količinu ima vodeni ekstrakt *P. longifolium* sa koncentracijom od 2 mg/ml. Posmatrajući rod *Peucedanum* najviše fenola zabeleženo je kod vrste *P. officinale* (koncentracija ekstrakta bila je 1 mg/ml). U okviru roda *Seseli*, najveću količinu fenola poseduje ekstrakt vrste *S. pallasii* s tim što je koncentracija ovog ekstrakta bila 3 mg/ml, dok je najmanje fenola bilo u ekstraktu *S. libanotis* subsp. *libanotis*, jer je koncentracija ovog ekstrakta bila 1 mg/ml. Za izradu ekstrakta nadzemnog dela vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije bilo dovoljno biljnog materijala. Nadzemni deo vrste *C. cristata* je pokazao veću količinu fenola u odnosu na plod ali je i rađen sa većom koncentracijom ekstrakta od 3 mg/ml. Za vrstu *O. hispidus* nije bilo dovoljno ekstrakta za ovu analizu, osim za nadzemni deo koji pokazuje prilično fenola. Vrste *E. serbicum* i *H. sphondylium* i u okviru ovog testa pokazuju sličnu količinu ukupnih fenola (koncentracije oba ekstrakta bile su 2 mg/ml). Acetonski ekstrakt vrste *T. maximum* je bio u malom prinosu, tako da nije bilo dovoljno za

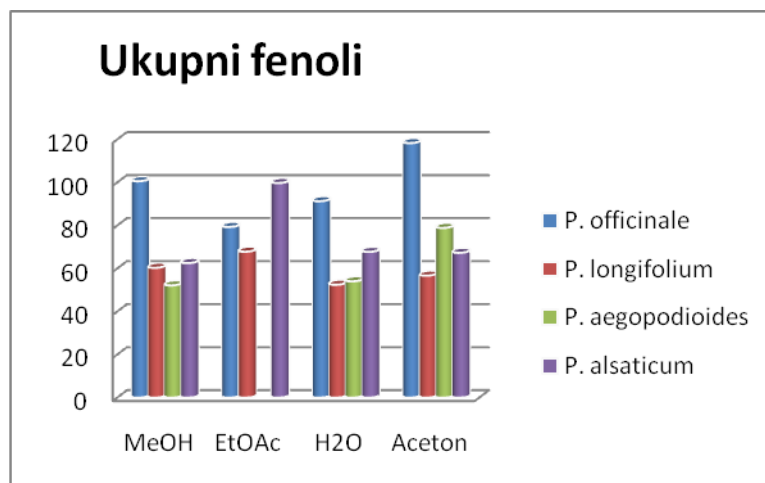
analizu ukupnih fenola. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu acetonskog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost.

Kao kontrola za utvrđivanje ukupne količine fenola u paralelnim eksperimentima su korišćeni dobro poznati antioksidansi BHA (3-tert-butil-4-hidroksianizol) i vitamin C. Dobijene vrednosti na osnovu kalibracionih kriva iznose 63.31 mg GAE/l za BHA i 40.91 mg GAE/l za vitamin C (koncentracije za oba uzorka bile su 0.1 mg/ml). U ovom slučaju BHA je pokazao veću količinu fenola u odnosu na vitamin C.

Generalno, najveći sadržaj fenola se nalazi u acetonskim, a najniži u etil-acetatnim ekstraktima. Antioksidativna aktivnost se može dovesti u vezu sa sadržajem polifenola, jer njihova količina uzrokuje visoku sposobnost vrste u deaktivaciji slobodnih radikala (Lu i Foo, 2002; Tepe i sar., 2004; Capecka i sar., 2005; Četković i sar., 2007; Fecka i Turek, 2008).

Posmatrajući rod *Peucedanum* (**Grafik 4.3.10**), najveća količina fenola zapažena je u acetonskom ekstraktu vrste *P. officinale*, što može biti jedno od objašnjenja zašto upravo ovaj ekstrakt ima i najbolju antioksidativnu aktivnost posmatrajući ABTS test.

**Grafik 4.3.10.** Ukupni polifenoli vrste roda *Peucedanum* predstavljeni kao ekvivalenti galne kiseline.





**Tabela 4.3.6.** Ukupan sadržaj polifenola u metanolnim, etil-acetatnim, acetonskim i vodenim ekstraktima analiziranih biljnih vrsta.

Ekstrakti	Biljne vrste	Konc. (mg/ml)	A <sub>1</sub>	Sadržaj ukupnih fenola (740nm)
<b>Metanolni ekstrakti</b>	<i>Peucedanum officinale</i>	1	1.35	100.61±0.001
	<i>P. longifolium</i>	2	0.82	60.36±0.002
	<i>P. aegopodioides</i>	1	0.71	52.18±0.007
	<i>P. alsaticum</i>	1	0.85	62.55±0.018
	<i>Seseli pallasii</i>	3	1.14	84.65±0.004
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1	1.15	85.03±0.004
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i>	2	1.18	87.52±0.005
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2	1.14	84.04±0.002
	<i>Cachrys cristata</i>	3	1.34	99.56±0.001
	<i>C. cristata</i> (plod)	2	1.21	89.87±0.005
	<i>Opopanax hispidus</i>	3	0.81	59.68±0.004
	<i>O. hispidus</i> (cvast)	1.5	1.21	89.95±0.005
	<i>O. hispidus</i> (plod)	2	1.07	78.82±0.002
	<i>Eryngium serbicum</i>	2	0.97	71.41±0.005
	<i>Heracleum sphondylium</i>	2	0.85	62.18±0.005
<i>Tordylium maximum</i>	5	1.13	83.36±0.003	
<b>Etil-acetatni ekstrakti</b>	<i>P. officinale</i>	5	1.07	79.35±0.002
	<i>P. longifolium</i>	5	0.92	67.85±0.004
	<i>P. alsaticum</i>	5	1.34	99.78±0.001
	<i>S. pallasii</i>	5	0.37	26.01±0.003
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	5	0.63	45.76±0.004
	<i>C. cristata</i>	5	0.55	39.78±0.005
	<i>C. cristata</i> (plod)	5	0.32	22.60±0.003
	<i>O. hispidus</i>	5	0.58	42.05±0.004
	<i>O. hispidus</i> (cvast)	5	1.15	85.10±0.004
	<i>O. hispidus</i> (plod)	5	0.64	46.36±0.005
	<i>E. serbicum</i>	5	0.79	57.64±0.003
	<i>H. sphondylium</i>	5	0.53	38.04±0.002
	<i>T. maximum</i>	5	–	–
<b>Vodeni ekstrakti</b>	<i>P. officinale</i>	1	1.23	91.30±0.003
	<i>P. longifolium</i>	2	0.72	52.49±0.004
	<i>P. aegopodioides</i>	1	0.74	54.08±0.002
	<i>P. alsaticum</i>	1	0.92	67.77±0.004

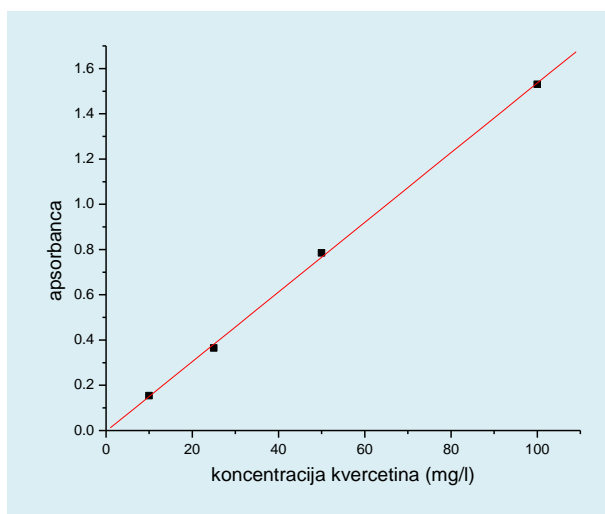
	<i>S. pallasii</i>	3	1.06	78.37±0.005
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1	0.95	69.97±0.004
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2	1.33	99.33±0.001
	<i>C. cristata</i> (plod)	2	1.07	79.35±0.002
	<i>O. hispidus</i>	3	0.91	67.02±0.003
	<i>E. serbicum</i>	2	1.22	90.10±0.004
	<i>H. sphondylium</i>	2	1.18	87.68±0.006
	<i>T. maximum</i>	3	1.01	74.59±0.004
<b>Acetonski ekstrakti</b>	<i>P. officinale</i>	1	1.59	118.32±0.003
	<i>P. longifolium</i>	2	0.77	56.72±0.003
	<i>P. aegopodioides</i>	1	1.07	78.89±0.004
	<i>P. alsaticum</i>	1	0.91	67.32±0.004
	<i>S. pallasii</i>	3	1.47	109.09±0.006
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1	0.78	57.41±0.005
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2	1.26	93.73±0.005
	<i>C. cristata</i>	3	2.23	166.97±0.006
	<i>C. cristata</i> (plod)	2	1.73	129.22±0.015
	<i>O. hispidus</i>	3	1.77	132.32±0.003
	<i>E. serbicum</i>	2	1.63	121.35±0.010
	<i>H. sphondylium</i>	2	1.48	110.15±0.005
<b>BHA</b>		0.1	0.86	63.31±0.001
<b>Vitamin C</b>		0.1	0.57	40.91±0.002

Za sve vrednosti u tabeli računata je srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija.

#### 4.3.4. Određivanje sadržaja flavonoida

Flavonoidi su polifenolna grupa jedinjenja. Oni poseduju određene biološke aktivnosti kao što su antiinflamatorna, antihepatotoksična, antialergijska, antivirusna i antitumorska aktivnost. Flavonoidi imaju sposobnost da inhibiraju enzime kao što su aldoza reduktaze i ksantin oksidaze. Oni su u stanju da efikasno uklanjaju reaktivne vrste kiseonika zbog svojih fenolnih hidroksilnih grupa što im omogućava dobar antioksidativni potencijal (Cao i sar., 1997). S obzirom na široku farmakološku i biološku aktivnost, fenoli imaju veći terapijski potencijal. Prisustvo visokog sadržaja flavonoida i fenola u ekstraktima direktno doprinosi jaku antioksidativnu aktivnost čija je uloga otklanjanje slobodnih radikala. Metoda koja je korišćena za utvrđivanje ukupnih flavonoida u ovom radu daje kompleks žute boje čija se apsorbancija meri na spektrofotometru na talasnoj dužini od 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima izražava se preko ekvivalenta kvercetin hidrata ( $Q_u$ , mg kvercetin hidrata po l) i dobija se tako što su koncentracije dobijene na osnovu kalibracione krive kvercetin hidrata pomnožene sa faktorom razblaženja.

**Grafik 4.3.11.** Kalibraciona kriva standarda kvercetina.



Ukupna količina flavonoida u metanolnim ekstraktima koji su rađeni u ovom radu kreće se u opsegu od 4.75 do 47.71 mg Qu/l. Ako se uzmu u obzir svi ekstrakti, najveća zastupljenost flavonoida bila je u ekstraktu vrste *T. maximum* (koncentracija ekstrakta 5 mg/ml), a najmanja u ekstraktu ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* sa koncentracijom od 2 mg/ml (**Tabela 4.3.7**). Posmatrajući rod *Peucedanum* najveća količina flavonoida primećena je kod vrste *P. officinale* (koncentracija ovog ekstrakta iznosi 1 mg/ml), dok najmanje flavonoida ima u ekstraktu vrste *P. longifolium* sa koncentracijom od 2 mg/ml. U okviru roda *Seseli* najveća količina flavonoida zabeležena je u ekstraktu vrste *S. pallasii* (koncentracija ovog ekstrakta bila je 3 mg/ml). Nadzemni deo vrste *C. cristata* je pokazao veću količinu flavonoida u odnosu na plod, ali je i rađen sa većom koncentracijom ekstrakta od 3 mg/ml. Kod vrste *O. hispidus*, rezultati su pokazali da bez obzira na to što je cvast rađena sa najmanjom koncentracijom od 1.5 mg/ml ima najveću količinu flavonoida, dok nadzemni deo (koncentracija ovog ekstrakta je najveća i iznosi 3 mg/ml) poseduje najslabiju aktivnost. Vrsta *H. sphondylium* imala je skoro duplo veću količinu flavonoida u odnosu na ekstrakt vrste *E. serbicum* (koncentracije oba ekstrakta bile su 2 mg/ml). Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu metanolnog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana ukupna količina flavonoida.

Sadržaj flavonoida etil-acetatnih ekstrakata se kretao u opsegu od 10.02 do 234.67 mg Qu/l (**Tabela 4.3.7**). Svi ekstrakti su rađeni sa koncentracijom od 5 mg/ml, jer generalno gledano etil-acetatni ekstrakti imaju najslabiji antioksidativni kapacitet. Međutim, rezultati su pokazali da upravo etil-acetatni ekstrakti sadrže najveću količinu flavonoida. Najveća količina flavonoida, kako u okviru roda tako i u odnosu na ostale ekstrakte, zabeležena je kod vrste *P. alsaticum*, dok najmanje flavonoida poseduje ekstrakt ploda *C. cristata*. Najmanju količinu flavonoida u okviru roda *Peucedanum* imala je vrsta *P. longifolium*, dok za vrstu *P. aegopodioides* nije bilo dovoljno etil-acetatnog ekstrakta za analizu. U okviru roda *Seseli*, veću količinu flavonoida imala je vrste *S. libanotis* subsp. *libanotis* u odnosu na *S. pallasii*, dok za analizu nadzemnog dela i ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije bilo dovoljno ekstrakta. Nadzemni deo vrste *C. cristata* je pokazao veću količinu flavonoida u odnosu na plod. Kod vrste *O. hispidus* rezultati su pokazali da plod ima veću količinu flavonoida u odnosu na cvast, dok za analizu nadzemnog dela nije

bilo dovoljno ekstrakta. Vrsta *H. sphondylium* je imala veću količinu flavonoida u odnosu na ekstrakt vrste *E. serbicum*. Etil-acetatni ekstrakt vrste *T. maximum* je pokazao prilično veliku količinu flavonoida. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu etil-acetatnog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost.

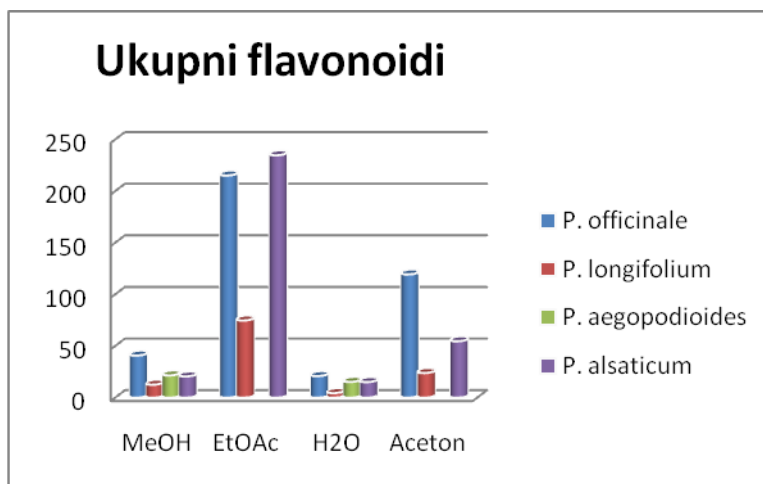
Količina ukupnih flavonoida vodenih ekstrakata koji su rađeni u ovom radu kreće se u opsegu od 4.43 do 27.57 mg Qu/l (**Tabela 4.3.7**). Najviše flavonoida zabeleženo je kod vrste *H. sphondylium* (koncentracija ovog ekstrakta je 2 mg/ml), dok najmanje flavonoida poseduje *P. longifolium* sa koncentracijom takođe od 2 mg/ml. Posmatrajući rod *Peucedanum* najveća količina flavonoida prisutna je kod vrste *P. officinale* (koncentracija ekstrakta od 1 mg/ml). U okviru roda *Seseli* najveća količina flavonoida prisutna je u ekstraktu ploda vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* sa koncentracijom ekstrakta od 2 mg/ml, dok je najmanje flavonoida prisutno u ekstraktu vrste *S. pallasii* (koncentracija ekstrakta bila je 3 mg/ml). Nadzemni deo *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije rađen usled nedostatka biljnog materijala. Ekstrak nadzemnog dela vrste *O. hispidus* (koncentracija ekstrakta 3 mg/ml) ima veću količinu flavonoida od ekstrakta ploda vrste *C. cristata* (koncentracija ekstrakta 2 mg/ml). Za ostale analize u okviru ova dva roda nije bilo dovoljno materijala. Vrsta *H. sphondylium* je imala veću količinu flavonoida u odnosu na ekstrakt vrste *E. serbicum*, kao i u odnosu na sve ostale vodene ekstrakte (koncentracije oba ekstrakta bile su 2 mg/ml). Vodeni ekstrakt vrste *T. maximum* sa koncentracijom od 3 mg/ml pokazuje relativno veliku količinu flavonoida. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu vodenog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost.

Za acetonske ekstrakte količina ukupnih flavonoida kretala se u opsegu od 8.27 do 119.32 mg Qu/l (**Tabela 4.3.7**). Najveća količina flavonoida zabeležena je u ekstraktu vrste *P. officinale* (koncentracija ovog ekstrakta je 1 mg/ml), dok najmanju količinu ima ekstrakt *S. libanotis* subsp. *libanotis* sa koncentracijom takođe od 1 mg/ml. Posmatrajući rod *Peucedanum* najmanje flavonoida zabeleženo je kod vrste *P. longifolium* (koncentracija ekstrakta bila je 2 mg/ml). U okviru roda *Seseli* najveću količinu flavonoida poseduje ekstrakt vrste *S. pallasii* što je koncentracija ovog ekstrakta bila 3 mg/ml, dok je najmanje flavonoida bilo u ekstraktu *S. libanotis* subsp. *libanotis*, jer je koncentracija ovog ekstrakta bila 1 mg/ml, to je ujedno i najmanja količina flavonoida u okviru svih ispitivanih

acetonskih ekstrakata. Za izradu ekstrakta nadzemnog dela vrste *S. libanotis* subsp. *intermedium* nije bilo dovoljno biljnog materijala. Nadzemni deo vrste *C. cristata* je pokazao veću količinu flavonoida u odnosu na plod, ali je i rađen sa većom koncentracijom ekstrakta od 3 mg/ml. Za vrstu *O. hispidus* nije bilo dovoljno ekstrakta za ovu analizu, osim za nadzemni deo koji pokazuje prilično flavonoida. Vrsta *H. sphondylium* je imala veću količinu flavonoida u odnosu na ekstrakt vrste *E. serbicum* (koncentracije oba ekstrakta bile su 2 mg/ml), dok vrsta *T. maximum* ima još veću količinu flavonoida u odnosu na ove dve ispitivane stim što je koncentracija ovog ekstrakta bila 3 mg/ml. Za vrstu *P. sativa* nije bilo biljnog materijala za izradu acetonskog ekstrakta i iz tog razloga nije ispitivana njena aktivnost.

Posmatrajući rod *Peucedanum* (**Grafik 4.3.12**) najveća količina flavonoida zapažena je u etil-acetatnom ekstraktu vrste *P. alsaticum*, što može biti jedno od objašnjenja da različiti tipovi rastvarača nose sa sobom različite komponente.

**Grafik 4.3.12.** Ukupni flavonoidi vrste roda *Peucedanum* predstavljeni kao ekvivalenti kvercetin hidrata.



**Tabela 4.3.7.** Ukupan sadržaj flavonoida u metanolnim, etil-acetatnim, acetonskim i vodenim ekstraktima analiziranih biljnih vrsta.

Ekstrakti	Biljne vrste	Konc. (mg/ml)	A <sub>1</sub>	Sadržaj ukupnih flavonoida (415nm)
<b>Metanolni ekstrakti</b>	<i>Peucedanum officinale</i>	1	0.62	40.75±0.003
	<i>P. longifolium</i>	2	0.19	12.55±0.002
	<i>P. aegopodioides</i>	1	0.33	21.52±0.002
	<i>P. alsaticum</i>	1	0.31	20.48±0.001
	<i>Seseli pallasii</i>	3	0.3	19.38±0.005
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1	0.19	12.42±0.001
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i>	2	0.25	16.39±0.002
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2	0.07	4.75±0.001
	<i>Cachrys cristata</i>	3	0.27	17.75±0.001
	<i>C. cristata</i> (plod)	2	0.14	9.30±0.001
	<i>O. hispidus</i>	3	0.28	18.60±0.003
	<i>Opopanax hispidus</i> (cvast)	1.5	0.37	24.06±0.004
	<i>O. hispidus</i> (plod)	2	0.33	21.46±0.004
	<i>Eryngium serbicum</i>	2	0.28	18.08±0.002
	<i>Heracleum sphondylium</i>	2	0.68	44.20±0.005
<i>Tordylium maximum</i>	5	0.73	47.71±0.006	
<b>Etil-acetatni ekstrakti</b>	<i>P. officinale</i>	5	3.31	215.11±0.000
	<i>P. longifolium</i>	5	1.15	74.74±0.003
	<i>P. alsaticum</i>	5	3.61	234.67±0.000
	<i>S. pallasii</i>	5	0.49	31.79±0.001
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	5	0.65	42.38±0.004
	<i>C. cristata</i>	5	0.7	46.02±0.004
	<i>C. cristata</i> (plod)	5	0.15	10.02±0.001
	<i>O. hispidus</i> (cvast)	5	1.18	76.96±0.004
	<i>O. hispidus</i> (plod)	5	1.19	77.28±0.004
	<i>E. serbicum</i>	5	1.11	72.41±0.003

	<i>H. sphondylium</i>	5	1.27	82.54±0.004
	<i>T. maximum</i>	5	2.61	169.69±0.022
<b>Vodeni ekstrakti</b>	<i>P. officinale</i>	1	0.32	20.87±0.002
	<i>P. longifolium</i>	2	0.07	4.43±0.001
	<i>P. aegopodioides</i>	1	0.23	15.21±0.005
	<i>P. alsaticum</i>	1	0.23	15.08±0.003
	<i>S. pallasii</i>	3	0.16	10.80±0.002
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1	0.22	14.50±0.014
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2	0.26	17.23±0.003
	<i>C. cristata</i> (plod)	2	0.16	10.41±0.002
	<i>O. hispidus</i>	3	0.29	18.73±0.004
	<i>E. serbicum</i>	2	0.27	17.49±0.004
	<i>H. sphondylium</i>	2	0.42	27.57±0.003
	<i>T. maximum</i>	3	0.31	20.48±0.002
<b>Acetonski ekstrakti</b>	<i>P. officinale</i>	1	1.83	119.32±0.003
	<i>P. longifolium</i>	2	0.36	23.86±0.008
	<i>P. alsaticum</i>	1	0.84	54.60±0.008
	<i>S. pallasii</i>	3	0.53	34.84±0.005
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	1	0.12	8.27±0.001
	<i>S. libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i> (plod)	2	0.28	18.40±0.005
	<i>C. cristata</i>	3	0.51	33.22±0.015
	<i>C. cristata</i> (plod)	2	0.13	8.91±0.002
	<i>O. hispidus</i>	3	0.33	21.39±0.004
	<i>E. serbicum</i>	2	0.57	37.18±0.001
	<i>H. sphondylium</i>	2	0.66	43.16±0.013
	<i>T. maximum</i>	3	0.81	53.04±0.006
<b>BHA</b>		0.1		–
<b>Vitamin C</b>		0.1		–

Za sve vrednosti u tabeli računata je srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija.



## 4.4. Opšta diskusija

Glavni cilj ovog rada bio je ispitivanje biološke aktivnosti odabranih vrsta iz familije Apiaceae: *Eryngium serbicum* Pančić, *Seseli pallasii* Besser, *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *libanotis*, *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *intermedium* (Rupr.) P. W. Ball, *Peucedanum officinale* L., *Peucedanum longifolium* W. et K., *Peucedanum aegopodioides* (Boiss.) Vand., *Peucedanum alsaticum* L., *Pastinaca sativa* L., *Heracleum sphondylium* L., *Tordylium maximum* L., *Cachrys cristata* DC., *Opopanax hispidus* (Friv.) Griseb. Određen je hemijski sastav kao i glavne komponente koje su odgovorne za samu biološku aktivnost etarskih ulja koja su korišćena u ovom radu. Dominantne komponente nadzemnog dela etarskog ulja vrste *C. cristata* su: fitol (13.1%), germakren D (12.9%),  $\beta$ -kariofilen (9.7%) i  $\beta$ -burbonen (8.5%), dok se u plodu sa najvećim procentom sreću komponente kao što su: suberozin (19.7%), germakren D (12.3%) i germakren B (10.0%) (Matejić i sar., 2012). Vrste *P. longifolium* i *P. officinale*, kao glavnu komponentu imale su (-)- $\alpha$ -pinen (4.0–38.7%), dok je za vrstu *P. alsaticum*, dominantna komponenta bila (+)- $\alpha$ -pinen (15.0%). Najhomogenija grupa zabeležena je u okviru tribusa Tordylieae. *Pastinaca sativa* kao glavne komponente sadrži (Z)- $\beta$ -ocimen (10.8%) i lavandulol acetat (5.2%), dok je etarsko ulje vrste *Tordylium maximum* okarakterisan prisustvom oktil izobutanoata (16.1%) i oktil 2-metilbutanoata (25.0%). Takođe, vrste koje pripadaju tribusu Apieae formiraju najheterogeniju grupu. *Libanotis montana* je jedina vrsta iz ovog tribusa koja sadrži eudesma-4(15),7-dien-1- $\beta$ -ol (1.2%) (Kapetanos i sar., 2008).

Ispitivana je antimikrobna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata (vodeni, metanolni, acetonski, etil-acetatni). Antimikrobna svojstva većine etarskih ulja su bazirana na fenolnim jedinjenjima koja su uglavnom zastupljena sa najvećim procentom u ukupnom ulju (Cosentino i sar., 1999). Međutim, postoje podaci koji ukazuju na to da i malo zastupljene komponente igraju važnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti, usled mogućeg sinergističkog delovanja sa ostalim komponentama (Paster i sar., 1995). Etarsko ulje koje je pokazalo najbolju antimikrobnu aktivnost bilo je ulje biljne vrste *E. serbicum*, dok se etarsko ulje vrste *S. pallasii* pokazalo kao najslabije. Od korišćenih ekstrakata najbolje antimikrobno delovanje imali su metanolni ekstrakti, zatim etil-acetatni i acetonski dok su vodeni bili

nešto slabiji. Odabir rastvarača vršen je na osnovu njihove polarnosti, jer se u rastvaračima različite polarnosti rastvaraju različita hemijska jedinjenja (Kovačević, 2004).

Pored toga urađena je i antioksidativna aktivnost (DPPH i ABTS test) za pomenute ekstrakte. Nedavna istraživanja su pokazala da antioksidansi biljnog porekla mogu imati veliki značaj kao terapijski agensi kod pojedinih bolesti izazvane usled oksidativnog stresa (Ramchoun i sar., 2009). Biljni ekstrakti i fitokonstituenti su efikasani jer deluju tako što uklanjaju slobodne radikale i inhibitoraju lipidnu peroksidaciju (Dash i sar., 2007; Yildirim i sar., 2001). Mnoga sintetička antioksidativna jedinjenja su pokazala toksična i/ili mutagena dejstva, što je podstaklo mnoge istraživače za pretragom prirodnih antioksidanasa (Nagulendran i sar., 2007). U radu vodeni ekstrakti su se pokazali kao jako dobri antioksidansi (DPPH test), zatim metanolni i acetonski ekstrakti (ABTS test), dok etil-acetatni ekstrakti vrlo slabo otklanjaju slobodne radikale. Obe metode su odgovorne za prikupljanje slobodnih radikala jer su njihovi mehanizmi delovanja slični. ABTS se dobro rastvara kako u vodi tako i u organskim rastvaračima i reaguje relativno brzo. Kada biljke sadrže antocijanine DPPH metod nije dovoljno precizan, što nije slučaj sa ABTS testom, naročito kada se apsorpcija meri na 734 nm (Arnao, 2000).

Da bi se potvrdila antioksidativna aktivnost samih ekstrakata određen je ukupni sadržaj fenola i flavonoida u njima. Fenolne komponente toksično deluju na mikroorganizme što su pokazali i utori Kuntz i sar. (1999). Najveća zastupljenost polifenola je u acetonskim ekstraktima, a najniža u etil-acetatnim ekstraktima, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima (Miliauskas, 2004; Džamić, 2010). Kao zaključak se može izvesti da etil-acetatni ekstrakti nisu pogodni za otklanjanje slobodnih radikala koji mogu da nanesu velike štete u čovekovom organizmu, dok vodeni, metanolni i acetonski ekstrakti predstavljaju dobre potencijalne antioksidanse. Sa druge strane, najveći sadržaj flavonoida se nalazi u etil-acetatnim i acetonskim ekstraktima, zatim idu metanolni i na kraju vodeni ekstrakti koji su pokazali jako niske vrednosti za ukupni sadržaj flavonoida. Najnovija istraživanja u oblasti hemije, biohemije i medicine potvrđuju da ekstrakti biljaka sadrže fenolne kiseline, flavone, izoflavone, flavanole, katehine, tokoferole tanine, terpene, te da pokazuju antineoplastična, antiviralna, antiinflamatorna, antialergijska i antioksidativna svojstva (Capasso i sar., 2005).

Antioksidansi su supstance koje imaju sposobnost da uklanjaju slobodne radikale i spreče ih da izazovu oštećenje ćelija. Oni daju zaštitni efekat, neutrališući slobodne radikale koji su toksični nusprodukti prirodnog ćelijskog metabolizma. Ljudsko telo prirodno proizvodi antioksidanse, ali proces nije 100% efikasan u slučaju prevelike proizvodnje slobodnih radikala, a efikasnost, takođe, opada sa godinama (Sies, 1991; Goldfarb, 1993).

Istraživanje sve više pokazuje da hrana bogata antioksidansima, kao i upotreba lekovitog bilja, mogu biti jako korisni za zdravlje. Hrana eventualno povećava nivo antioksidanasa jer namirnice sadrže puno antioksidativnih supstanci. Voće i povrće su poznati po ključnim antioksidansima kao što su vitamini A, C, E,  $\beta$ -karoten i važni minerali, uključujući selen i cink. Voće, povrće i lekovito bilje su najbogatiji izvori antioksidativnih supstanci (Sies i sar., 1992).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Iz rezultata dobijenih analizom etarskih ulja istraživanih vrsta, može se zaključiti da su dominantne komponente nadzemnog dela etarskog ulja vrste *Cachrys cristata* - fitol (13.1%), germakren D (12.9%),  $\beta$ -kariofilen (9.7%) i  $\beta$ -burbonen (8.5%), dok se u plodu sa najvećim procentom sreću komponente kao što su: suberozin (19.7%), germakren D (12.3%) i germakren B (10.0%).
2. Sva testirana ulja poseduju antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, koja se može predstaviti na sledeći način: *Eryngium serbicum* > *Peucedanum aegopodioides* > *P. officinale* > *P. longifolium* > *Heracleum sphondylium* > *Seseli libanotis* ssp. *libanotis* > *Pastinaca sativa* > *Seseli pallasii*.
3. Kada se uporede rezultati antimikrobnog ispitivanja različitih tipova ekstrakata biljnih vrsta: *Eryngium serbicum*, *Seseli pallasii*, *S. libanotis* subsp. *libanotis*, *S. libanotis* subsp. *intermedium* (nadzemni deo i plod), *Heracleum sphondylium*, *Tordylium maximum*, *Cachrys cristata* (nadzemni deo i plod) i *Opopanax hispidus* (nadzemni deo, cvast i plod) može se uočiti sledeći potencijal ekstrakata: metanol > etil-acetat > aceton > voda.
4. Generalno je grupa Gram (+) bakterija bila osetljivija u odnosu na grupu Gram (-) bakterija, a naročito dobro delovanje je zabeleženo protiv sojeva *Bacillus cereus* i *Listeria monocytogenes* koji su česti uzročnici kvarenja hrane, te se ove (uglavnom začinske) biljke mogu koristiti i kao prirodni konzervansi za hranu.
5. Antibakterijski i antifungalni potencijal ekstrakta vrsta roda *Peucedanum* se može predstaviti na sledeći način: aceton > etil-acetat > metanol > voda.
6. Kod ovih ekstrakata najosetljivija vrsta je bila *Salmonella typhimurium*, dok se *Listeria monocytogenes* pokazala kao najotpornija bakterijska vrsta. Rezultati testiranih gljiva pokazuju da je *A. ochraceus* bila najosetljivija, dok je *Candida albicans* bila najrezistentnija.
7. Poređenjem aktivnosti ekstrakta sa komercijalnim antibiotikom i antimikotikom može se uočiti da testirani uzorci pokazuju slabiji antibakterijski i antifungalni potencijal.

8. Rezultati antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata DPPH metodom, koji su dobijeni iz suvog materijala analiziranih vrsta pokazali su da najjači efekat ima vrsta *Seseli libanotis* subsp. *libanotis*, a najniži vrsta *Tordylium maximum*. Antioksidativna aktivnost etil-acetatnih ekstrakata je bila najslabija u odnosu na aktivnost ostalih ekstrakata. Njihova EC<sub>50</sub> se kretala od 2.550 mg/ml za *Peucedanum alsaticum* do 25.276 mg/ml za *Seseli pallasii*. Vodeni ekstrakti dobijeni iz suvog biljnog materijala postupkom liofilizacije pokazuju da je najbolju antioksidativnu aktivnost imala vrsta *Peucedanum officinale*, dok najslabiju aktivnost pokazuje vrsta *P. longifolium*. Najjači efekat kod acetonskog ekstrakta je zapažen kod vrste *P. officinale*, a najniži kod ekstrakta ploda vrste *Cachrys cristata*.
9. Najjači antioksidativni kapacitet od svih testiranih uzoraka imao je vodeni ekstrakt biljne vrste *Peucedanu officinale*. Vodeni, metanolni i acetonski ekstrakti pokazali su približno isti antioksidativni kapacitet, dok etil-acetatni ekstrakti znatno odstupaju sa svojim vrednostima.
10. Najbolja antioksidativna aktivnost utvrđena ABTS-testom pokazala se kod metanolnog ekstrakta vrste *P. officinale* (koncentracija ovog ekstrakta je 1 mg/ml), dok najslabiju aktivnost ima *P. aegopodioides* sa koncentracijom od 1 mg/ml. Najbolja antioksidativna aktivnost etil-acetatnih ekstrakata zabeležena je kod vrste *P. alsaticum*, dok najslabiju aktivnost ima *Tordylium maximum*. Vodeni ekstrakt vrste *Eryngium serbicum* (koncentracija ovog ekstrakta je 2 mg/ml) se pokazao kao najbolji, dok najslabiju aktivnost ima *Peucedanum longifolium* sa koncentracijom takođe od 2 mg/ml. Najbolju antioksidativnu aktivnost poseduje acetonski ekstrakt vrste *P. officinale* (koncentracija ovog ekstrakta je 1 mg/ml), dok najslabiju aktivnost ima *Seseli libanotis* subsp. *libanotis* sa koncentracijom takođe od 1 mg/ml. Najjači antioksidativni kapacitet od svih testiranih uzoraka, posmatrajući ABTS test, imao je acetonski ekstrakt biljne vrste *Peucedanum officinale*.
11. Najveća zastupljenost polifenola je detektovana u metanolnom ekstraktu *Peucedanum officinale*, a najmanja u ekstraktu vrste *P. aegopodioides*. Kod etil-acetatnih ekstrakata najviše fenola zabeleženo je kod vrste *P. alsaticum*, dok najmanje fenola poseduje ekstrakt ploda *Cachrys cristata*. Vodeni ekstrakt vrste *Seseli libanotis* subsp.

*intermedium* (koncentracija ovog ekstrakta je 2 mg/ml) poseduje najviše fenola, dok najmanje fenola poseduje *Peucedanum longifolium* sa koncentracijom takođe od 2 mg/ml. Za acetonske ekstrakte najveća količina fenola zabeležena je u ekstraktu nadzemnog dela vrste *Cachrys cristata* (koncentracija ovog ekstrakta je 3 mg/ml), dok najmanju količinu ima vodeni ekstrakt *Peucedanum longifolium* sa koncentracijom od 2 mg/ml. Generalno, najveći sadržaj fenola se nalazi u acetonskim, a najniži u etil-acetatnim ekstraktima. Antioksidativna aktivnost se može dovesti u vezu sa sadržajem polifenola, jer njihova količina uzrokuje visoku sposobnost vrste u deaktivaciji slobodnih radikala.

**12.** Najveća zastupljenost flavonoida u metanolnim ekstraktima bila je kod vrste *Tordylium maximum* (koncentracija ekstrakta 5 mg/ml), a najmanja u ekstraktu ploda vrste *Seseli libanotis* subsp. *intermedium* sa koncentracijom od 2 mg/ml. U okviru etil-acetatnih ekstrakata se pokazalo da je sadržaj flavonoida najveći u odnosu na ostale ekstrakte. Najveća količina flavonoida zabeležena je kod vrste *Peucedanum alsaticum*, dok najmanje flavonoida poseduje ekstrakt ploda *Cachrys cristata*. Količina ukupnih flavonoida vodenih ekstrakata pokazuje da najviše flavonoida ima vrsta *Heracleum sphondylium* (koncentracija ovog ekstrakta je 2 mg/ml), dok najmanje flavonoida poseduje *Peucedanum longifolium* sa koncentracijom takođe od 2 mg/ml. Najveća količina flavonoida zabeležena u acetonskim ekstraktima je kod vrste *P. officinale* (koncentracija ovog ekstrakta je 1 mg/ml), dok najmanju količinu ima ekstrakt *Seseli libanotis* subsp. *libanotis* sa koncentracijom takođe od 1 mg/ml. Generalno, najveći sadržaj flavonoida se nalazi u etil-acetatnim i acetonskim ekstraktima, zatim idu metanolni i na kraju vodeni ekstrakti koji su pokazali jako niske vrednosti za ukupni sadržaj flavonoida.

**13.** Dobijeni rezultati pokazuju da vrste iz familije Apiaceae predstavljaju potencijalni izvor novih jedinjenja sa antioksidativnom i antimikrobnom aktivnošću. Stalno korišćenje antibiotika uticalo je da su mnoge bakterije postale rezistentne, a moderni način života doveo je do pojave velikog broja bolesti izazvane oksidativnim stresom, čime se nameće potreba za izolovanjem i identifikacijom što većeg broja antimikrobnih i antioksidativnih jedinjenja iz biljnih izvora koja su farmakološki moćna i imaju nizak ili

nikakav sporedni efekat za upotrebu kako u medicini tako i u industriji hrane. Povećanje znanja o fitokonstituentima kao biološki aktivnim materijama i njihovim uključivanjem u svakodnevnu upotrebu i ishranu mogu da daju dovoljnu podršku ljudskom telu u borbi protiv mnogih bolesti.

- 14.** Dosadašnja istraživanja predstavljaju široku osnovu za dalja ispitivanja bioloških aktivnosti biljaka iz familije Apiaceae. Neophodno je preciznije određivanje aktivnih komponenti koje se sreću u ekstraktima. Predlaže se priprema farmaceutskih preparata baziranih na najaktivnijim komponentama eteričkih ulja i ekstrakata ovih biljaka, za koje je utvrđeno da su nosioci ispoljene antimikrobne i antioksidativne aktivnosti.

## 6. LITERATURA

- Adams R. (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4<sup>th</sup> Ed. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL, USA.
- Agarwal A., Prabakaran SA. (2005) Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian. J. Exp. Biol.*, 43, 963-974.
- Aggarwal KK., Khanuja SPS., Ateeque A., Kumar TRS., Gupta VK., Kumar S. (2002) Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour Frag. J.*, 17, 59-63.
- Al-Fatimi M., Wurster M., Schroder G., Lindequis, U. (2007) Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacol.*, 111, 657-666.
- Ali ATMM., Al-Swayeh OA., Al-Rashed RS., Al-Mofleh IA., Al-Dohayan AD., Al-Tuwajri AS. (1996) Role of oxygen-derived free radicals on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion. *Saudi J. Gastroenterol.*, 2, 19-28.
- Arnao MB. (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trend. Food Sci. Technol.*, 11, 419-421.
- Avato P. (1997) The genus *Thapsia* as source of bioactive compounds. In: Verotta L. (Ed.), Virtual activity, real pharmacology—different approaches to the search for bioactive natural compounds. Research Signpost, Trivandrum, pp. 17-31.
- Bagchi K., Puri S. (1998) Free radicals and antioxidants in health and disease. *Eastern Mediterr. Health J.*, 4, 350-360.
- Bahorun T., Soobrattee MA., Luximon-Ramma V., Aruoma OI. (2006) Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Int. J. Med. Upd.*, 1, 1-17.
- Ball PW. (1968) Genus *Seseli*. In: Tutin TG., Heywood VH., Burges NA., Moore DM., Valentine DH., Walters SM., Webb DA. (Eds.), *Flora Europaea 2*. Cambridge University Press, London, UK, pp. 334-338.



- Bancole SA. (1997) Effect of essential oils from two Nigerian medicinal plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on growth and Aflatoxin B1 production in maize grain by atoxigenic *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 190-192.
- Barnes BJ., Wiederhold NP., Micek ST., Polish LB., Ritchie DJ. (2003) Enterobacter cloacae ventriculitis successfully treated with cefepime and gentamicin: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy*, 23(4), 537–542.
- Bartnic M., Głowniak K. (2007) Furanocoumarins from *Peucedanum tauricum* Bieb. and their variability in the aerial parts of the plant during development. *Acta Chromatogr.*, 18, 5-14.
- Baser KHC., Demirci B., Akalin E., Ozhatay N. (2004) Composition of the microdistilled essential oils of *Cachrys alpina* Bieb. *J. Essent. Oil Res.*, 16, 167-168.
- Baser KHC., Ermin N., Adiguzel N., Aytac Z. (1996) Composition of essential oil of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. *J. Essent. Oil Res.*, 8, 297-298.
- Baser KHC., Ozek T., Aytac Z. (2000) Composition essential oil of the *Hippomarathrum boissieri* Reuter et Hausskn. *J. Essent. Oil Res.*, 12, 231-232.
- Batzing BL. (2001) Microbiology an introduction. State University Collage of New York at Cortland.
- Baytop T. (1999) Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İlaveli İkinci Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, p.375.
- Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P. (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 149–154.
- Bennis S., Chami F., Chami N., Bouchikhi T., Remmal A. (2004) Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38, 454-458.
- Bentham G. (1867) Umbelliferae. In: Bentham G., Hooker JD. (Eds.), *Genera plantarum*, vol. 1. Reeve, London, UK, pp. 859–931.
- Blois MS. (1958). Antioxidant determination by the use of stabile free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.

- Bondet V., Brand-Williams W., Berset, C. (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method, *LWT-Food Sci. Technol.*, 30, 609-615.
- Bouderdara N., Elomri A., Djarri L., Medjroubi K., Seguin E., Vérité P. (2011) Chemical composition of the essential oil of *Cachrys libanotis* from Algeria. *Nat. Prod. Commun.*, 6, 7-115.
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28, 25-30.
- Britton G. (1983) The biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 79–110.
- Cao G., Sofic E., Prior RL. (1997) Antioxidant and pro-oxidant behaviour of flavonoids: structure activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 749-760.
- Capasso F., Gaginella TS., Grandolini G., Izzo AA. (2005) Fitoterapija – Priručnik biljne medicine. Prometej, Novi Sad.
- Capecka E., Mareczek A., Leja M. (2005) Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem.*, 93, 223-226.
- Capetanos C., Saroglou V., Marin PD., Simić A., Skaltsa HD. (2007) Essential oil analysis of two endemic *Eryngium* species from Serbia. *J. Serb. Chem. Soc.*, 72(10), 961–965.
- Carlile MJ., Watkinson SC., Gooday GW. (2006) The funngi. Second Edition. Elsevier, Academic Press.
- Carson CF., Mee BJ., Riley TV. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Ch.*, 46(6), 1914–1920.
- Cerceau-Larrival M-Th. (1962) Plantules et pollens d'ombellifères. Memoires du Museum national d'Histoire naturelle, serie B. *Botanique*, 14, 1–166.

- Ćetković GS., Čanadanović-Brunet JM., Djilas SM, Tumbas VT., Markov SL., Cvetković DD. (2007) Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* L. subsp. *kitaibelii* extracts. *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 1013-1027.
- Chan PK. (2007) Acylation with diangeloyl groups at C21–22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. *Biochem. Pharmacol.*, 73, 341–350.
- Chater AO. (1968) Genus *Eryngium* L In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (Eds.), *Flora Europaea* 2. Cambridge University Press, London, UK, pp. 320-324.
- Chizzola R. (2010) Essential oil composition of wild growing Apiaceae from Europe and the Mediterranean. *Nat. Prod. Commun.*, 5(9), 1477-92.
- Cody V., Middleton E., Harborne JB. (1986) *Plant flavonoids in biology and medicine-biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*. Alan R. Liss, New York.
- Conner DE., Beuchat LR. (1984) Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, 49, 429–434.
- Constance L. (1971) History of the classification of Umbelliferae (Apiaceae). In: Heywood VH. (Ed.), *The biology and chemistry of the Umbelliferae*. Academic Press, London, UK, pp. 1–8.
- Corsi G., Pagni AM. (1991) Secretory structures and systematics problem on *Apiaceae*. *Botanika chronika*, 10, 707-711.
- Cosentino S., Tuberoso CIG., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. (1999) *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 130–135.
- Cox SD., Mann CM., Markham JL., Bell HC., Gustafson JE., Warmington JR. (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil from *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Bacteriol.*, 88, 170-175.
- Cox SD., Mann CM., Markham JL., Gustafson JE., Warmington JR., Wyllie SG. (2001) Determination the antimicrobial action of tea tree oil. *Molecules*, 6(1), 87-91.

- Cui CB. (1996) Spirotryprostatin B, a novel mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.*, 49(8), 832–835.
- D'Acquarica I., Di Giovanni MC., Gasparri F., Misiti D., D'Arrigo C., Fagnano N., Guarnieri D., Iacono G., Bifulco G., Riccio R. (2002) Isolation and structure elucidation of four new triterpenoid estersaponins from fruits of *Pittosporum tobira* AIT. *Tetrahedron*, 58, 10127–10136.
- Daifas DP., Smith JP., Blanchfield B., Sanders G., Austin JW., Koukoutsis J. (2004) Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 313-322.
- Daouk RK., Dagher SM., Sattout JE. (1995) Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *J. Food Protect.*, 58, 1147-1149.
- Dash DK., Yeligar VC., Nayak SS., Ghosh T., Rajalingam D., Sengupta P., Maiti BC., Maity TK. (2007) Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of *Ichnocarpus frutescens* (Linn.) R.Br. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Trop. J. Pharm. Res.*, 6, 755-765.
- Dashek WV. (2006) Biomolecules II: Biologically important molecules. In: Dashek WV, Harrison M. (Eds.), *Plant cell biology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp. 76-106.
- Davies KJA. (1991) *Oxidative damage and repair: chemical, biological and medical aspects*. Pergamon, Oxford.
- Daw ZY., El-Baroty GE., Mahmoud-Ebtesam A. (1994) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Chem. Microbiol. Tehnol. Lebensm*, 16, 129.
- De Candolle AP. (1830) Umbelliferae. In: De Candolle AP. (Ed.), *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*, vol. 4. Treuttel et Wurtz, Paris, France, pp. 55–250.
- De Guzman CC., Siemosma JS. (1999) *Spices*, No. 13. Prosea, Leiden.
- Deans SG., Ritchie G. (1987) Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, 5, 165–180.
- Denyer SP., Hugo WB. (1991) Mechanisms of antibacterial action – A summary. In: Denyer SP., Hugo WB. (Eds.), *Mechanisms of action of chemical biocides*. Blackwell, Oxford, pp. 331-334.

- Dimić G., Kocić-Tanackov O., Jovanov D., Cvetković S. Markov A. (2010) Presence of *Listeria* species in fresh meats from retail markets in Serbia. *Acta Period. Technol.*, 41, 1-6.
- Dixon RA., Paiva NL. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Dorman HJD., Deans SG. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. App. Microbiol.*, 88, 308-316.
- Downie SR., Katz-Downie DS. (1996) A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Am. J. Bot.*, 83, 234–251.
- Downie SR., Katz-Downie DS., Cho K-J. (1996) Phylogenetic analysis of Apiaceae subfamily Apioideae using nucleotide sequences from the chloroplast *rpoCI* intron. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 6, 1–18.
- Downie SR., Ramanath S., Katz-Downie DS., Llanas E. (1998) Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoCI* intron sequences. *Am. J. Bot.*, 85, 563–591.
- Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82, 47-95.
- Drude CGO. (1898) Umbelliferae. In: Engler A., Prantl K. (Eds.), Die naturlichen Pflanzenfamilien, 3(8). Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany, pp. 63–250.
- Dufor D., Pichette A., Mshvildadze V., Bradette-Hebert M., Lavoie S., Longtin A., Laprise C., Legault J. (2007) Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *J. Ethnopharmacol.*, 111, 22-28.
- Džamić A. (2010) Sastav, antifungalna i antioksidativna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata odabranih vrsta familije Lamiaceae. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- El-Ansari M., Nawwar MA., Saleh NAM. (1995) Stachysetin, a diapiogenin-7-glucoside-p-p'-dihydroxytruxinate from *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry*, 40(5), 1543.

- Ellis MB., Ellis JP. (1997) *Microfungi on land plants. An identification handbook.* The Richmond Publishing Co. Ltd.
- Elmastaş M., Gülcin I., Beydemir S., Küfrevioğlu OI., Aboul-Enein HY. (2006) A study on the *in vitro* antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Anal. Lett.*, 39(1), 47-65.
- Erdelmeier CAJ., Sticher O. (1986) A cyclohexenone and a cyclohexadienone glycoside from *Eryngium campestre*. *Phytochemistry*, 25, 741–743.
- Esau K. (1977) *Anatomy of seed plants*, 2nd ed. John Wiley and Sons., New York, Santa Barbara, London, Sydney, Toronto.
- European Pharmacopoeia (2004): 5<sup>th</sup> edition, 2.8.12 Council of Europe. Strasbourg Cedex, France, 217-218.
- Evergetis E., Michaelakis A., Haroutounian AS. (2012) Essential oils of Umbelliferae (Apiaceae) family taxa as emerging potent agents for mosquito control. In: Soloneski S. (Ed), *integrated pest management and pest control - current and future tactics.* University Campus Step Ri, Rijeka, Croatia, 613-638.
- Faleiro ML., Miguel MG., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito JC., Figueiredo AC., Barroso JG., Pedro LG. (2002) Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36, 35-40.
- Fecka I., Turek S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herb drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet majoram by chromatographic techniques. *Food Chem.*, 108, 1039-1053.
- Fu G., Liu Y., Yu S., Huang X., Hu Y., Chen X., Zhang F. (2006) Cytotoxic oxygenated triterpenoid saponins from *Symplocos chinensis*. *J. Nat. Prod.*, 69, 1680–1686.
- Goldfarb AH. (1993) Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sport Exer.*, 25, 232-236.
- Gorunović SM., Lukić BP. (2001) *Farmakognozija.* Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Gravsen S., Frisvad CJ., Samson AR. (1994) *Microfungi.* Munksgaard, 74-153.
- Greenblat CL., Baum J., Klein BY., Nachshon S., Koltunov V., Cano R.J. (2004) *Micrococcus luteus* – Survival in Amber. *Microbial. Ecology*, 48(1), 120–127.

- Guern J., Renaudin JP., Brown SC. (1987) The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures. In: Constabel F., Vasil IK. (Eds.), Cell culture in phytochemistry. Academic Press, London, UK, pp. 43–76.
- Gupta SK., Joshi S., Velpandian T., Awor L., Prakash J. (1997) An update on pharmacological prospective for prevention and development of cataract. *Indian J. Pharmacol.*, 23, 3-10.
- Gustafson RG., Turner RD., Lutz RA., Vrijenhoek RC. (1998) A new genus and five new species of mussels (Bivalvia, Mytilidae) from deep-sea sulfide/hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico. *Malacologia*, 40, 63–112.
- Halliwell B. (1993) *Aruoma OI, DNA and free radicals*. Ellis Horwood, Chichester.
- Halliwell B. (1997) Antioxidants and human diseases: a general introduction. *Nutr. Rev.*, 55, 44-52.
- Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. T.*, 35, 1147-1150.
- Halliwell B., Gutteridge JMC. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hanamantagouda MS., Kakkalameli SB., Naik PM., Negalla P., Seetharamareddy HR., Murthy HN. (2010) Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chem.*, 118, 836-839.
- Handa SS., Khanuja SPS., Longo G., Rakesh DD. (2008) *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Trieste: ICS UNIDO.
- Hanel H., Raether W. (1998) A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses*, 31, 148-154.
- Harborne JB. (1994) *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall, Cambridge, UK.
- Harborne JB., Williams CA. (2000) *Advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Harman GE., Howell CR., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004) *Trichoderma* species-opportunistic avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2(1), 43–56.

- Harpaz S., Glatman L., Drabkin V., Gelman A. (2003) Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J. Food Prot.*, 66(3), 410–417.
- Harris ED. (1992) Regulation of antioxidant enzymes. *J. Nutr.*, 122, 625-626.
- Hiller K. (1965) Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger *Saniculoideae*. 1. *Sanicula europea* L. Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen- und Rosmarinsäure. *Pharmazie*, 20, 574-579.
- Hiller K., Kothe N. (1967) Chlorogen und Rosmarinsäure Vorkommen und quantitative Verteilung in Pflanzen der *Saniculoideae*. *Pharmazie*, 22, 220-221.
- Himejima M., Kubo I. (1993) Fungicidal activity of polygodial in combination with anethole and indole against *Candida albicans*. *J. Agricultur Food Sci.*, 41, 1776.
- Hinneburg I., Dorman HJD., Hiltunen R. (2006) Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.*, 97(1), 122-129.
- Hormaeche E., Edwards PR. (1960a) A proposed genus *Enterobacter*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, 10, 71–74.
- Huang D., Ou B., Prior RL. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841–1856.
- Jacob RA. (1995) The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.*, 15, 755-766.
- Janačković P., Soković M., Vujisić L., Vajs V., Vucković I., Krivosej Z., Marin PD. (2011) Composition and antimicrobial activity of *Seseli globiferum* essential oil. *Nat. Prod. Commun.*, 6(8), 1163-1166.
- Janićijević HS., Kenić J., Arsić-Komljenović G. (2008) Antioksidantni potencijal biljke matočina (*Mellitis Melisophyllum*). *Praxis Medica*, 36(3-4), 083-087.
- Jančić R., Stošić D., Mimica-Dukić N., Lakušić B. (1995) Aromatične biljke Srbije. NIP Dečije novine, Beograd-Gornji Milanovac.
- Jawetz MA. (2007) *Medical Microbiology*, 24th Ed. McGraw-Hill Medical, p. 832.
- Juliano C., Mattana A., Usai M. (2000) Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *J. Essent. Oil Res.*, 12, 516–522.



- Kalembe D., Kunicka A. (2003) Antibacterial i antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.*, 10, 818-825.
- Kamboj VP. (2000) Herbal medicine. *Curr. Sci.*, 78, 35-39.
- Kapetanios C., Karioti A., Bojović S., Marin P., Veljić M., Skaltsa H. (2008) Chemical and principal-component analyses of the essential oils of Apioideae taxa (Apiaceae) from Central Balkan. *Chem. Biodivers.*, 5, 101-119.
- Karakašević B. (1977) Mikrobiologija i parazitologija. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga.
- Katz-Downie DS., Valiejo-Roman CM., Terentieva EI., Troitsky AV., Pimenov MG., Lee B., Downie SR. (1999) Towards a molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: additional information from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Plant Syst. Evol.*, 216, 167–195.
- Kayser FH., Bienz KA., Eckert J., Zinkernagel RM. (2005) Medical microbiology. Thieme, p.167, 168, 229-233, 251-253, 285, 292-293, 308-310.
- Kehrer JP., Smith CV. (1994) Free radicals in biology: sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases, In: Frei B. (Ed.), Natural antioxidants in human health and disease. Academic Press, San Diego, pp. 25-62.
- Khadijah S., Neo SY., Hossain MS., Miller LD., Mathavan S., Kwang J. (2003) Identification of white spot syndrome virus latency-related genes in specific-pathogen-free shrimps by use of a microarray. *J. Virol.*, 77(18), 10162-10167.
- Khoshbakht K., Hammer K., Pistrick, K. (2007) *Eryngium caucasicum* Trautv. cultivated as a vegetable in the Elburz Mountains (Northern Iran). *Genet. Resour Crop Evol.*, 54, 445–448.
- Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis, N. (1989) Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent Oil Res.*, 1, 119–128.
- Kofinas C., Chinou I., Loukis A., Harvala C., Maillard M., Hostettmann K. (1998) Flavonoids and bioactive coumarins of *Tordylium apulum*. *Phytochem.*, 48, 637-641.

- Kofinas C., Chinou I., Loukis A., Harvala C., Roussakis C., Maillard M., Hostettmann K. (1998) Cytotoxic coumarins from *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. *Planta Med.*, 64, 174-176.
- Kofinas C., Chinou J., Harvala A., Gally A. (1993) Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tordylium apulum* L., *J. Essent Oil Res.*, 5, 33-36.
- Koleva I., van Beek TA., Linssen J P H., de Groot A., Evastatieva LjN. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.*, 13, 8-17.
- Koso-Poljansky BM. (1916) Sciadophytorum systematis lineamenta. *Bulletin de la Societe imperiale des Naturalistes (Moscou)*, 29, 93–222.
- Kovačević N. (2004) Osnovi farmakognoziije. Treće izdanje. Institut za farmakognoziiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu. Srpska školska knjiga, Beograd.
- Kubo M., Lunde C.S. (1995) Naturally occurring anti-*Salmonella* agents. *J. Agricultur Food Sci.*, 43, 1629.
- Kuntz S., Wenzel U., Daniel H. (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr.*, 38(3), 133.
- Küpeli E., Kartal M., Aslan S., Yesilada E. (2006) Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. *J. Ethnopharmacol.*, 107(1), 32-37.
- Kurkcuoglu M., Baser KHC., Vural M. (2006) Composition of the essential oil of *Pastinaca sativa* L. subsp. *urens* (Req. ex Godron) Celak. *Chem. Nat. Compd.*, 42(1), 114-115.
- Lambert RJW., Skandamis PJ., Coote G., Nychas JE. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91(3), 453-462.
- Lampe JW. (1999) Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 475-490.
- Langseth L. (1996) Oxidants, antioxidants and disease prevention. International Life Science Institute, Belgium.

- Le Claire E., Schwaiger S., Banaigs B., Stuppner H., Gafner F. (2005) Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and other Apiaceae. *J. Agr. Food Chem.*, 53(11), 4367–4372.
- Lis-Blachin M., Ochoka RJ., Deans SG., Asztemborska M., Hart S. (1999) Differences in bioactivity between the enantiomers of  $\alpha$ -pinene. *J. Essent. Oil Res.*, 11, 393–397.
- Lopez V., Akerreta S., Casanova E., Garcia-Mina JM., Cavero RY., Calvo MI. (2007) *In vitro* antioxidant anti-rhizopus activities of Lamiaceae herbal extracts. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 62, 151-155.
- Lu Y., Foo LY. (2001) Antioxidant activities of polyphenols from Sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.*, 75, 197-202.
- Lu Y., Foo LY. (2002) Polyphenolics of *Salvia* – a review. *Phytochemistry*, 59, 117-140.
- Macheix JJ., Fleuriet A., Billot J. (1990) Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Manavalan K., Ramasamy C. (2001) Physical pharmaceutics, ed 2. Vignesh Publishers, Chennai.
- Marin PD. (2003) Biohemijaska i molekularna sistematika biljaka. NNK international, Beograd.
- Marino M., Bersani C., Comi G. (1999) Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Protect.*, 62(9), 1017–1023.
- Marino M., Bersani C., Comi G. (2001) Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. I. *J. Food Microbiol.*, 76, 187-195.
- Maruzzella JC., Balter J. (1959) The action of essential oils on phytopathogenic fungi. *Plant Dis. Rep.*, 43, 1143-1147.
- Matejić J, Džamić A., Mihajilov-Krstev T., Randelović V., Krivošej Z., Marin P. (2012) Total phenolic content, flavonoid concentration, antioxidant and antimicrobial activity of methanol extracts from three *Seseli* L. taxa. *Cent. Eur. J. Biol.*, 7(6), 1116-1122.

- Matejić J, Džamić A., Mihajilov-Krstev T., Randelović V., Krivošej Z., Marin P. (2013) Total phenolic and flavonoid content, antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *Tordylium maximum*. *J. Appl. Pharm. Scil.*, 3(01), 055-059.
- Matejić J., Džamić A., Ristić M., Randelović V., Marin P. (2012) Essential oil composition of *Cachrys cristata* – a rare and endangered species in the flora of serbia. *Nat. Prod. Commun.*, 7(2), 235-236.
- Matsuda H., Li Y., Murakami T., Ninomiya K., Yamahara J., Yoshikawa M. (1997) Effects of escins Ia, Ib, IIa, and IIb from horse chestnut, the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., on acute inflammation in animals. *Biol. Pharm. Bull.*, 20, 1092–1095.
- McGimpsey JA., Douglas MH., Van Klink JL., Beauregard DA., Perry NB. (1994) Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour Frag. J.*, 9, 347– 352.
- Metcalf CR., Chalk L. (1989) *Anatomy of the Dicotyledons*. Systematic anatomy of the leaf and stem, 2nd ed. Clarendon press, Oxford press, Oxford.
- Miean KH., Mohamed S. (2001) Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agr. Food Chem.*, 49, 3106-12.
- Mihajilov-Krstev T. (2009) Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta roda *Satureja* L. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek TA. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.*, 85, 231-237.
- Miller DM., Buettner GR., Aust SD. (1990) Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. *Free Radical Bio. Med.*, 8, 95–108.
- Miller N., Rice-Evans C. (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Res.*, 26, 195–199.
- Milosavljević S., Tesević V., Vucković I., Jadranin M., Vajs V., Soković M., Janačković P., Jovanović A. (2007) Composition and antifungal activity of the essential oil of *Seseli annuum* wild-growing in Serbia. *Fitoterapia*, 78(4), 319-322.

- Milovanović M., Picuric-Jovanovic K., Vucelic-Radovic B., Vrbaski Z. (1996) Antioxidant effects of flavonoids of *Anthriscus sylvestris* in lard. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(6), 773-776.
- Monties B., Lignins U. (1989) Methods in plant biochemistry. In: Dey PM., Harborne JB. (Eds.), *Botanische jahrbucher syst.* Academic Press, London, UK, pp. 113–157.
- Morison R. (1672) *Plantarum umbelliferarum distributio nova.* Oxford.
- Nagendrappa CG. (2005) An appreciation of free radical chemistry- 3, free radicals in diseases and health. *Resonance*, 10, 65-73.
- Nagulendran K., Velavan S., Mahesh R., Begum VH. (2007) *In vitro* antioxidant activity and total polyphenolic content of *Cyperus rotundus* rhizomes. *E.-J. Chem.*, 4, 440-449.
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003): Performance standards for anti-microbial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA.
- Nguefack J., Budde BB., Jakobsen M. (2004) Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmatic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 395-400.
- Nikaido H. (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 264, 382–388.
- Nikolić V. (1973) Fam. Apiaceae. In: Josifović M. (Ed.), *Flora SR Srbije* 5. Beograd, Srbija, SANU, pp. 183-348.
- O'donovan DJ., Fernandes CJ. (2004) Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxid. Redox Sign.*, 6, 169-176.
- O'Gorman CM., Fuller HT., Dyer PS. (2008) Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228), 471–4.
- Okoh OO., Sedimenko AP., Afolayan AJ. (2009) Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by

- hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chem.* (U štampi).
- Ollanketo M., Peltoketo A., Hartonen K., Hiltunen R., Riekkola M.-L. (2002) Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *Eur. Food Res. Technol.*, 215, 158-163.
- Oluwaseun AA., Ganiyu O. (2008) Antioxidant properties of methanolic extracts of mistletoes (*Viscum album*) from cocoa and cashew trees in Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.*, 7, 3138-3142.
- Özek G., Özek T., Hüsnü Can Baser K., Hamzaoglu E., Duran A. (2007) Composition of Essential oil of *Hippomarathrum cristatum* (DC.) Boiss. *J. Essenl. Oil Res.*, 19, 540-542.
- Özer H., Sökmen M., Güllüce M., Adigüzel A., Şahin F., Sökmen A., Kiliç H., Bariş Ö. (2007) Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of *Hippomarathrum microcarpum* (Bieb.) from Turkey. *J. Agr. Food Chem.*, 55, 937-942.
- Özgen U., Kaya Y., Houghton P. (2012) Folk medicines in the villages of Ilıca District (Erzurum, Turkey). *Turk. J. Biol.*, 36, 93-106.
- Ozturk A., Ozturk S., Kartal, S. (2000) The characteristics and uses of herbs added to herby cheeses in Van. *Herb. J. Syst. Bot.*, 7, 167–181.
- Ozturk S., Ercisli S. (2006) Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Seseli libanotis*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 261-265.
- Pacher P., Beckman JS., Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 87, 315-424.
- Pagni AM. (1985) A caryological, anatomical and histochemical investigation of *Athamanta cortiana* Ferrarini (*Umbelliferae*). *Candollea*, 40, 139-145.
- Pagni AM., Corsi G., Capelletti EM. (1989) Fruit morpho-anatomical aspects and secretory structures in three related *Athamanta* species (*Umbelliferae*). *Botanische Jahrbucher Syst.*, 106(2), 211-220.

- Palá-Paúl J., Velasco-Neguerula A., Pérez-Alonso MJ., Maqueda J. (2004) Volatile oil constituents from different parts of *Cachrys trifida* L. *J. Essent. Oil Res.*, 16, 347-349.
- Palá-Paúl J., Velasco-Neguerula A., Pérez-Alonso MJ., Sanz J. (2002) Essential oil composition of the aerial parts of *Cachrys sicula* L. *Flavour Frag. J.*, 17, 64-68.
- Paster N., Menasherov M., Ravid U., Juven B. (1995) Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. Food Protect.*, 58(1), 81–85.
- Pavela R. (2011) Screening of Eurasian plants for insecticidal and growth inhibition activity against *Spodoptera littoralis* larvae. *Afr. J. Agr. Res.*, 6(12), 2895-2907.
- Pavlović S., Živanović P., Jančić R., Ševarda, LA. (1989) Prilog boljem poznavanju anatomskih osobina i hemijskih odlika vrste *Libanotis montana* Cr. Subsp. *Leiocarpa* (Heuff.). *Sod. Glasnik prirodnjačkog muzeja u Beogradu*, B, 43/44, 17-25.
- Pepetti A., Daglia M., Aceti C., Sordelli B., Spini V., Carazzone C., Gazzani G. (2008) Hydroxycinnamic acid derivatives occurring in *Cichorium endivia* vegetables. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis*, 48, 472-476.
- Petrović S. (1883) Lekovito bilje u Srbiji. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo, odeljak drugi, knjiga XVI, Kralj.-srp. Državna štamparija, Beograd.
- Petrović S., Mijin D., Stojanović N. (2005) Hemija prirodnih organskih jedinjenja. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 303-320.
- Pham-Huy LA., He H., Pham-Huy C. (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.*, 4, 89-96.
- Phulan R., Neeraj, KH. (2004) Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for the anti-enteric potential against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. *Phytother. Res.*, 18, 670-3.
- Pieroni A., Janiak V., Dürr CM., Lüdeke S., Trachsel E., Heinrich M. (2002) *In vitro* antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in southern Italy. *Phytother. Res.*, 16, 467–473.

- Pimenov MG., Leonov MV. (1993) The genera of the Umbelliferae. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K.
- Ping W., Zushang S., Wei Y., Guangrui D., Shiyu L. (2012) Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops*, 3, 99-120.
- Plunkett GM., Downie SR. (1999) Major lineages within Apiaceae subfamily Apioideae: a comparison of chloroplast restriction site and DNA sequence data. *Am. J. Bot.*, 86, 1014–1026.
- Plunkett GM., Soltis DE., Soltis PS. (1996) Evolutionary patterns in Apiaceae: inferences based on *matK* sequence data. *Syst. Bot.*, 21, 477–495.
- Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarpotto E. (2004) Oxidative stress and cell signaling. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1163–1182.
- Pourmorad F., Hosseinimehr SJ., Shahabimajd N. (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*, 5, 1142-1145.
- Prior RL., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290–4302.
- Proestos C., Chorianopoukos N., Nychas G-JE., 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.
- Radev M., Radkov M., Joče, S. (1988) Infektiozni bolesti. Medicina i fizkultura, Sofia.
- Ramaswamy V., Cresence VM., Rejitha JS., Lekshmi MU., Dharsana KS., Prasad SP., Vijila HM. (2007) *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 40(1), 4-13.
- Ramchoun M., Harnafi H., Alem C., Benlys M., Elrhaffari L., Amrani S. (2009) Study on antioxidant and hypolipidemic effects of polyphenol rich extract from *Thymus vulgaris* and *Lavendula multifida*. *Pharmacognosy Res.*, 1, 106-112.
- Randjelović N., Randjelović V. (1999) *Cachrys cristata* DC. In: Stevanovic V. (Ed.), The Red data book of flora of Serbia. Exinct and critically endangered taxa. Ministry of



- Environment of the Republic of Serbia, Faculty of Biology, University of Belgrade, Institution for Protection of Nature of the Republic of Serbia, Beograd, Serbia, pp. 177-178.
- Ranković B. (2003) Sistematika gljiva. Prorodno-matematički fakultet, Kragujevac.
- Raper KB., Fennell DI. (1952) Two noteworthy fungi from Liberian soil. *Amer. J. Bot.*, 39, 79–86.
- Ratledge C., Wilkinson SG. (1988) An overview of microbial lipids. In: Ratledge C., Wilkinson SG. (Eds.). *Microbial lipids*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 3–22.
- Reddy BYM., Angers P., Gosselin A., Arul J. (1998) Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 47, 535-550.
- Roginsky V., Lissi EA. (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 92, 235–254.
- Russell AD. (2003) Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet. Infect. Dis.*, 3, 794–803.
- Sarić RM. (1989) Lekovite biljke SR Srbije. Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Posebno izdanje, Knj. 65, Beograd.
- Sarker SD., Eynon E., Fok K., Kumarasamy Y., Murphy EM., Nahar L., Shaheen EM., Shaw NM., Siakalima M. (2003) Screening the extracts of the seeds of *Achillea millefolium*, *Angelica sylvestris* and *Phleum pratense* for antibacterial, antioxidant activities and general toxicity. *Orient. Pharm. Exp. Med.*, 3, 157-162.
- Sartoratto A., Machado ALM., Delarmelina C., Figueira GM., Duarte MCT., Rehder VLG. (2004) Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 35, 275–280.
- Schechter M. (2004) The desk encyclopedia of microbiology. Elsevier Ltd., 410.
- Schillaci D., Venturella F., Venuti F., Plescia F. (2003) Antimicrobial and antiproliferative activity of *Peucedanum nebrodense* (Guss.) Strohl. *J. Ethnopharmacol.*, 87, 99-101.
- Schinkovitz A., Gibbons S., Stavri M., Michael J., Edge C., Bucar F. (2003) An antimycobacterial coumarin from the roots of *Peucedanum ostruthium*. *Planta Med.*, 69, 369-71.

- Sefidkon F., Shaabani A. (2003) Analysis of the oil of *Hippomarathrum microcarpum* (M. B.) B. Fedtsch. from Iran. *J. Essent. Oil. Res.*, 15, 261-262.
- Sen S., Chakraborty R., De B., Mazumder J. (2009) Plants and phytochemicals for peptic ulcer: an overview. *Pharmacogn. Rev.*, 3, 270-279.
- Sen S., Chakraborty R., Sridhar C., Reddy YSR., De B. (2010) Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 3(1), 91-100.
- Sevastre B., Vostinaru O., Mogosan C., Marcus I., Tămas M., Deliu C. (2007) Antiinflammatory activity of *Peucedanum officinale* on rats. *Bulletin USAMV-CN*, 64(1-2), 295-298.
- Shinde V., Dhalwal K., Paradkar AR., Mahadik KR., Kadam SS. (2006) Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of human placental extract. *Pharmacologyonline*, 3, 172-179.
- Siems WG., Grune T., Esterbauer H. (1995) 4-hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Sci.*, 57, 785–789.
- Sieniawska E., Glowniak K. (2011) Identification of the coumarin compounds in the *Mutellina purpurea* extracts. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia, Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin, Poland*, 26(13), 97-104.
- Sies H. (1991) *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Academic Press, London.
- Sies H., Stahl W., Sundquist AR. (1992) Antioxidant function of vitamins, vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 669, 7-20.
- Sikkema J., De Bont JAM., Poolman B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269(11), 8022–8028.
- Sikkema J., De Bont JAM., Poolman B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59(2), 201–222.
- Siljegović J., Glamoclija J., Soković M., Vucković I., Tesević V., Milosavljević S., Stesević D. (2011) Composition and antimicrobial activity of *Seseli montanum* subsp. *tommasinii* essential oil. *Nat. Prod. Commun.*, 6(2), 263-266.

- Sims GK., Sommers LE., Konopka A. (1986) Degradation of pyridine by *Micrococcus luteus* isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(5), 963–968.
- Singleton VL., Orthofer R., Lamuela-Raventos RM. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.*, 299, 152–178.
- Singleton VL., Rossi JA. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(48), 144-158.
- Sirtori C.R. (2001) Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacol. Res.*, 44, 183–193.
- Skalicka-Woźniak K., Los R., Głowniak K., Malm A. (2010) Antimicrobial activity of fatty acids from fruits of *Peucedanum cervaria* and *P. alsaticum*. *Chem. Biodivers.*, 7(11), 2748-2754.
- Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas GJE. (2001) Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Ital. J. Food Sci.*, 13(1), 65–75.
- Škrinjar M. (1979) Mikološka i mikotoksikološka ispitivanja sira tipa Edamer. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Smid EJ., Gorris LGM. (1999) Natural antimicrobials for food preservation. In: Shaurr Rahman M. (Ed.), Handbook of food preservation. Marcel Dekker, New York, pp. 285–308.
- Smith K., Neafie R., Yeager J., Skelton H. (1999) *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. *Br. J. Dermatol.*, 141(3), 558–61.
- 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  $\alpha$ -toxin by *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 53, 1023-1027.
- Stadtman ER. (2004) Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1105–1112.
- Stahl-Biskup E., Wichtmann E-M. (1991) Composition of the essential oils from roots of some apiaceae in relation to the development of their oil duct systems. *Flavour Frag. J.*, 6(4), 249–255.

- Stevanović V., Tan K., Iatrou G. (2003) Distribution of the endemic Balkan flora on serpentine I. – obligate serpentine endemics. *Pl. Syst. Evol.*, 242, 149-170.
- Stjepanović L., Ćorović M., Pavlović S. (1973) Morfološko-anatomske odlike i etarsko ulje divljeg komorača (*Portenschlagia ramosissima*). *Acta. Pharm. Jugoslav.*, 23, 231-235.
- Stojanović-Radić Z. (2011) Biotička aktivnost etarskih ulja odabranih biljaka iz familije Asteraceae i mehanizmi njihovog antibakterijskog delovanja u uslovima *in vitro*. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu.
- Stojković S., Petrović S., Kukić J., Dzamić A., Ristić M., Milenković M., Glamoclija J., Soković M., Stojković D. (2007) Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Seseli rigidum* flower essential oil. *Chem. Nat. Comp.*, 45(2), 253-256.
- Strack D. (1997) Phenolic metabolism. In: Dey PM., Harborne JB (Eds.), *Plant biochemistry*. Academic Press, New York, pp. 387–437.
- Strange, RN. (1993) *Plant disease control: Towards environmentally acceptable methods*. Chapman and Hall, New York, 354.
- Strohi AW., Rouse H., Fisher DB. (2001) *Microbiology*. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- Sukhdev SH., Suman PSK., Gennaro L., Dev DR. (2008) *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. International Centre for Science and High Technology, Trieste.
- Sun T., Simon PW., Tanumihardjo SA. (2009) Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota* L.) of various colors. *J. Agr. Food Chem.*, 57(10), 4142–4147.
- Takaisi-Kikuni NB., Kruger D., Gnann W., Wecke J. (1996) Microcalorimetric and electron microscopic investigation on the effects of essential oil from *Cymbopogon densiflorus* on *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol.*, 88, 55.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissou M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.*, 90, 333-340.

- Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candas F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissou M., Sokmen A. (2004) Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptanta* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chem.*, 84, 519-525.
- Tian Y., Jiang B., An L., Bao Y. (2007) Neuroprotective effect of catalpol against MPP+-induced oxidative stress in mesencephalic neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 568, 142-148.
- Tiwari AK. (2001) Imbalance in antioxidant defence and human disease: multiple approach of natural antioxidants therapy. *Curr. Sci.*, 81, 1179–1187.
- Tiwari AK. (2004) Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Curr Sci.*, 86, 1092-1102.
- Tosun A. (2011) Comparative analyses of the essential oils from *Tordylium* L. species growing in Turkey. *Turk. J. Pharm. Sci.*, 8(3), 239-246.
- Trillini B., Pintore G., Chessa M., Menghini L. (2006) Essential oil composition of *Tordylium apulum* L. from Italy. *J. Essent. Oil Res.*, 18(1), 51-52.
- Tucakov J. (1986) Lečenje biljem. Izdavačka Radna Organizacija "RAD", Beograd.
- Tutin TG. (1968) Genus *Cachrys*. In: Tutin TG., Heywood VH., Burges NA., Moore DM., Valentine DH., Walters SM., Webb DA. (Eds.), *Flora Europaea 2*. Cambridge University Press, London, UK, p. 343.
- Tutin TG. (1968) Genus *Opopanax*. In: Tutin TG., Heywood VH., Burges NA., Moore DM., Valentine DH., Walters SM., Webb DA. (Eds.), *Flora Europaea 2*. Cambridge University Press, London, UK, p. 360.
- Ultee A., Bennink MHJ., Moezelaar R. (2002) The phenolichydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *App. Environ. Microb.*, 68, 1561–1568.
- Umeljić V. (2002) U svetu cveća i pčela, Atlas medonosnog bilja 1. Kolor pres, Lapovo-Kragujevac.
- Umeljić V. (2003) U svetu cveća i pčela, Atlas medonosnog bilja 2. Kolor pres, Lapovo-Kragujevac.

- Vaara M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.*, 56(3), 395–411.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes CJ., Telser J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.*, 266, 37–56.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MTD., Mazur M., Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44–84.
- Valko M., Rhodes CJ., Moncola J., Izakovic M., Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.-Biol. Interact.*, 160, 1–40.
- Waksmundzka-Hajnos M., Petruczynik A., Dragan A., Wianowska D., Dawidowicz A., Sowa I. (2004) Influence of the extraction mode on the yield of some furanocoumarins from *Pastinaca sativa* fruits. *J. Chromatogr. B.*, 800(2004), 181–187.
- Wallace G., Fry SC. (1994) Phenolic components of the plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.*, 151, 229-267.
- Wallach O. (1914) Terpene und camphor, 2nd ed. Vit, Leipzig.
- Wang P., Su Z., Yuan W., Deng G., Li S. (2012) Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceut. Crop.*, 3, 99–120.
- Wei F., Ma LY., Jin WT., Ma SC., Han GZ., Khan IA., Lin RC. (2004) Antiinflammatory triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 1246–1248.
- Weidenborner M., Hindorf H., Jha H. C., Tsotsonos P. (1990) Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. *Phytochemistry*, 29(4), 1103-1105.
- Weidenborner M., Jha HC. (1994) Structure-activity relationships among isoflavonoids with regard to their antifungal properties. *Mycol. Res.*, 98, 1376-1378.
- Weidenborner M., Jha HC. (1997) Antifungal specter of flavons and flavonoids tested on 34 different fungi. *Mycol. Res.*, 101(6), 733-736.

- Wendakoon CN., Sakaguchi M. (1995) Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Protect.*, 58(3), 280–283.
- Wilkinson JM., Hipwell M., Ryan T., Cavanagh HMA. (2003) Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *J. Agr. Food Chem.*, 51, 76-81.
- Willcox JK., Ash SL., Catignani GL. (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44, 275-295.
- Woisky R., Salatin, A. (1998) Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.*, 37, 99-105.
- Wollenweber E. (1994) Flavones and flavonols. In: Harborne JB. (Ed.), *The flavonoids: advances in research since 1986*. Cambridge, UK: Chapman i Hall, pp. 259–335.
- Xing-Yu L., Bao-Jun W., Cheng-Ying J., Shuang-Jiang L. (2007) *Micrococcus flavus* sp. nov., isolated from activated sludge in a bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 57, 66–69.
- Yang XW., Zhao J., Cui YX., Liu XH., Ma CM., Hattori M., Zhang LH. (1999) Anti-HIV-1 protease triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *J. Nat. Prod.* 62, 1510–1513.
- Yildirim A., Oktay M., Bulaloulu V. (2001) The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk. J. Med. Sci.*, 31, 23-27.
- Zgórka G., Głowniak K. (2001) Variation of free phenolic acid in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis.*, 26, 79-87.
- Zhang ZZ., Li SY. (2007) Cytotoxic triterpenoid saponins from the fruits of *Aesculus pavia* L. *Phytochemistry*, 68, 2075–2086.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Jelena Matejić rođena je 01.03.1983. godine u Nišu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Nišu 2007. godine, sa prosečnom ocenom u toku studija 9,36. Diplomski rad pod naslovom "Flora i vegetacija Batušinačkih bara kod Niša." odbranila sa ocenom 10. Doktorske studije na smeru Eksperimentalna i primenjena botanika na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala 2007/2008. godine. Položila sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10.

Od 01.03.2008. godine zaposlena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu, u zvanju saradnik u nastavi, a od 2010. godine radi kao asistent gde je izabrana za užu naučnu oblast Biologija, predmet Botanika, gde i danas radi.

Tokom dosadašnjeg rada autor je i koautor većeg broja naučnih radova objavljenih u zemlji i inostranstvu. Učestvovala je na nekoliko međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova, gde je saopštavala rezultate svojih istraživanja.

Kao član Organizacionog odbora učestvovala je u organizaciju 8., 9. i 10., a 2013. godine i u organizaciji 11. Simpozijuma o flori jugoistočne Srbije i susednih područja. Ima sertifikat za pohađanje internacionalne Letnje škole masene spektrometrije u trajanju od 15. do 19. jula 2008. godine, na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu. Posедуje uverenje o pohađanju Škole tečne hromatografije, iz teorijske i praktične nastave u periodu od 15. do 19. septembra 2008. godine, od strane Hemijskog fakulteta u Beogradu. Kao član biološkog društva "Dr Sava Petrović" učestvovala je u mnogim akcijama vezanim za zaštitu i očuvanje životne sredine.

Jelena Matejić trenutno je angažovana na projektu pod nazivom « Mikromorfološka, fitohemijska, molekularna i istraživanja biljaka – sistemski, ekološki i primenljivi aspekti » (Program osnovnih istraživanja MNP Ev. br.173029) (2011-2014).



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана Јелена С. Матејић

број уписа ЕВ 070003

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

### Биолошка активност етарских уља и екстраката одабраних врста из фамилије *Ariaceae*

- 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 докторанда

У Београду, 18.03.2013.

Јелена Матејић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Јелена С. Матејић

Број уписа: ЕВ 070003

Студијски програм: Експериментална и примењена ботаника

Наслов рада: Биолошка активност етарских уља и екстраката одабраних врста из фамилије Ариасеае

Ментори: др Петар Д. Марин и др Ана Џамић

Потписани Јелена С. Матејић

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 18.03.2013.

*Јелена Матејић*

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

### **Биолошка активност етарских уља и екстраката одабраних врста из фамилије *Apiaceae***

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 Београду 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, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 18.03.2013.

Телена Матијевић