



UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Ivana S. Dimitrijević

**Analiza hemijskog sastava i biološke aktivnosti  
lišajeva *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl., *Peltigera  
horizontalis* (Hudson) Baumg. i *Cladonia  
rangiformis* Hoffm.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,  
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању  
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,  
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

**НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:**

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе, осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Niš, 2021.



UNIVERZITET U NIŠU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Ivana S. Dimitrijević

**Analiza hemijskog sastava i biološke aktivnosti  
lišajeva *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl., *Peltigera  
horizontalis* (Hudson) Baumg. i *Cladonia  
rangiformis* Hoffm.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



**Ivana S. Dimitrijević**

**Analysis of the chemical composition and  
biological activity of lichens *Ramalina capitata*  
(Ach.) Nyl., *Peltigera horizontalis* (Hudson) Baumg.  
and *Cladonia rangiformis* Hoffm.**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021.

## Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	др Гордана Стојановић, редовни професор Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу
Наслов:	Анализа хемијског састава и биолошке активности лишајева <i>Ramalina capitata</i> (Ach.) Nyl., <i>Peltigera horizontalis</i> (Hudson) Baumg. и <i>Cladonia rangiformis</i> Hoffm.
Резиме:	<p>У оквиру ове докторске дисертације одређен је хемијски састав ацетонских, етил-ацетатаних, етарских и дихлорметанских екстраката, као и антибактеријска, антиоксидативна, генотоксична и антихолинестеразна активност ацетонских екстраката лишајева <i>Ramalina capitata</i>, <i>Peltigera horizontalis</i> и <i>Cladonia rangiformis</i>. Одређен је садржај двадесет макро и микроелемената. Најзаступљенија компонента испитиваних екстраката лишаја <i>R. capitata</i> је евернична киселина, а код лишаја <i>C. rangiformis</i> атранорин. Главни конституент испитиваних екстраката апотеција и целокупног лишаја <i>P. horizontalis</i> је тенуиорин, док је доминантна компонента талуса лишаја <i>P. horizontalis</i> метил-гирофорат. Орцинол-монометил-етар, орцинол, евернична киселина и уснинска киселина су најзаступљеније испарљиве компоненте ацетонског, етарског, етил-ацетатног и дихлорметанског екстракта лишаја <i>R. capitata</i> (редом). Најдоминантнији испарљиви конституенти лишаја <i>P. horizontalis</i> су метил-орселинат и додецил-акрилат (у етарским екстрактима талуса и апотеција), док је у свим испитиваним екстрактима лишаја <i>C. rangiformis</i> најзаступљенија рангиформна киселина. Лишај <i>P. horizontalis</i> има највећи садржај макро и микроелемената, изузев Na, Co, Pb и Si, чији је садржај највећи у лишају <i>R. capitata</i>. Жива је детектована само у лишају <i>R. capitata</i>. Ацетонски екстракти <i>R. capitata</i> и <i>C. rangiformis</i> показују умерену бактерицидну активност на Грам-позитивне бактерије. Грам-негативне бактерије резистентне су према свим испитиваним екстрактима. Највећи антиоксидативни капацитет према DPPH и ABTS методи има ацетонски екстракт апотеција лишаја <i>P. horizontalis</i>, а према CUPRAC методи екстракт <i>C. rangiformis</i>. Највећи садржај укупних фенола и вредност укупне редукционе моћи има ацетонски екстракт <i>R. capitata</i>. Испитивани екстракти у концентрацији од 2 µg/ml изазивају највеће смањење учесталости микронуклеуса, а најбољи ефекат међу њима показује екстракт талуса <i>P. horizontalis</i>. Сви ацетонски екстракти у концентрацији од 10 mg/ml поседују инхибирајући ефекат на активност ензима холинестеразе, а највећи степен инхибиције забележен је за талус лишаја <i>P. horizontalis</i>.</p>



Научна област:	Хемија
Научна дисциплина:	Органска хемија и биохемија
Кључне речи:	<i>Ramalina capitata</i> , <i>Peltigera horizontalis</i> , <i>Cladonia rangiformis</i> , HPLC, GC-MS, макро и микроелементи, антиоксидативна активност, антимикуробна активност, антихолинестеразна активност, микронуклеусни тест
УДК:	581.192 : 582.29(043.3) 581.5 : 582.29 (043.3)
CERIF класификација:	P 003 и P 390 Хемија и Органска хемија
Тип лиценце Креативне заједнице:	<b>CC BY-NC-ND</b>

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Gordana Stojanović Ph.D., Full professor, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš
Title:	Analysis of the chemical composition and biological activity of lichens <i>Ramalina capitata</i> (Ach.) Nyl., <i>Peltigera horizontalis</i> (Hudson) Baumg. and <i>Cladonia rangiformis</i> Hoffm.
Abstract:	<p>Within this doctoral dissertation, the chemical composition of acetone, ethyl acetate, ether and dichloromethane extracts was determined, as well as the antibacterial, antioxidant, genotoxic and anticholinesterase activity of acetone extracts of lichens <i>Ramalina capitata</i>, <i>Peltigera horizontalis</i> and <i>Cladonia rangiformis</i>. The content of twenty macro and microelements was determined. The most common component of the tested <i>R. capitata</i> extracts was evernic acid, and in lichen <i>C. rangiformis</i> atranorin. The main constituent of the examined extracts of apothecia and entire lichen <i>P. horizontalis</i> was tenuiorin, while methyl gyroforate was the dominant component of <i>P. horizontalis</i> talus. Orcinol-monomethyl ether, orcinol, evernic acid and usnic acid were the most common volatile components of acetone, ether, ethyl acetate and dichloromethane extracts of <i>R. capitata</i> (respectively). The most dominant volatile constituents of <i>P. horizontalis</i> were methyl orselinate and dodecyl acrylate (in talus and apothecia ether extracts), while rangiformic acid was the most abundant in all examined <i>C. rangiformis</i> extracts. Lichen <i>P. horizontalis</i> had the highest content of macro and microelements, except for Na, Co, Pb and Si, whose content was highest in <i>R. capitata</i>. Mercury was detected only in <i>R. capitata</i>. <i>Ramalina capitata</i> and <i>C. rangiformis</i> extracts showed moderate bactericidal activity against Gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria were resistant to the all tested extracts. The highest antioxidant capacity, according to DPPH and ABTS method, showed in apothecia acetone extract of <i>P. horizontalis</i>, and <i>C. rangiformis</i> extract according to CUPRAC method. The highest content of total phenols and the value of total reducing power was shown in <i>R. capitata</i> extract. The tested extracts at a concentration of 2 µg/ml caused the most pronounced reduction in the frequency of micronuclei, and the best effect among them was shown by the <i>P. horizontalis</i> talus. All acetone extracts at a concentration of 10 mg/ml had an inhibitory effect on the activity of the enzyme cholinesterase, and the highest inhibition was observed in the case of the <i>P. horizontalis</i> talus.</p>
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	Organic Chemistry and Biochemistry

---

Key Words: *Ramalina capitata*, *Peltigera horizontalis*, *Cladonia rangiformis*, HPLC, GC-MS, macro and microelements, antioxidant activity, antimicrobial activity, anticholinesterase activity, micronucleus test

UDC: 581.192 : 582.29(043.3)  
581.5 : 582.29 (043.3)

CERIF  
Classification: P 003 i P 390, Chemistry and Organic Chemistry

Creative  
Commons  
License Type: **CC BY-NC-ND**



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ**

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА**

Редни број, <b>РБР:</b>	
Идентификациони број, <b>ИБР:</b>	
Тип документације, <b>ТД:</b>	монографска
Тип записа, <b>ТЗ:</b>	текстуални / графички
Врста рада, <b>ВР:</b>	докторска дисертација
Аутор, <b>АУ:</b>	Ивана С. Димитријевић
Ментор, <b>МН:</b>	Гордана Стојановић
Наслов рада, <b>НР:</b>	Анализа хемијског састава и биолошке активности лишајева <i>Ramalina capitata</i> (Ach.) Nyl., <i>Peltigera horizontalis</i> (Hudson) Baumg. и <i>Cladonia rangiformis</i> Hoffm.
Језик публикације, <b>ЈП:</b>	српски
Језик извода, <b>ЈИ:</b>	енглески
Земља публикавања, <b>ЗП:</b>	Србија
Уже географско подручје, <b>УГП:</b>	Србија
Година, <b>ГО:</b>	2021.
Издавач, <b>ИЗ:</b>	ауторски репринт
Место и адреса, <b>МА:</b>	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, <b>ФО:</b> (поглавља/страница/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	5 поглавља, 118 страна, 132 цитата, 17 табела, 32 слике, 55 прилога
Научна област, <b>НО:</b>	Хемија
Научна дисциплина, <b>НД:</b>	Органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, <b>ПО:</b>	<i>Ramalina capitata</i> , <i>Peltigera horizontalis</i> , <i>Cladonia rangiformis</i> , HPLC, GC-MS, макро и микроелементи, антиоксидативна активност, антимикробна активност, антихолинестеразна активност, микронуклеусни тест
<b>УДК</b>	581.192 : 582.29(043.3) 581.5 : 582.29 (043.3)
Чува се, <b>ЧУ:</b>	библиотека
Важна напомена, <b>ВН:</b>	Израда ове докторске дисертације је финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројекта ОИ 172047 а завршена на основу уговора о реализацији и финансирању научноистраживачког рада НИО, број 451-03-9/2021-14/200124.

Извод, ИЗ:

У оквиру ове докторске дисертације одређен је хемијски састав ацетонских, етил-ацетатаних, етарских и дихлорметанских екстраката, као и антибактеријска, антиоксидативна, генотоксична и антихолинестеразна активност ацетонских екстраката лишајева *Ramalina capitata*, *Peltigera horizontalis* и *Cladonia rangiformis*. Одређен је садржај двадесет макро и микроелемената. Најзаступљенија компонента испитиваних екстраката лишаја *R. capitata* је евернична киселина, а код лишаја *C. rangiformis* атранорин. Главни конституент испитиваних екстраката апотеција и целокупног лишаја *P. horizontalis* је тенуиорин, док је доминантна компонента талуса лишаја *P. horizontalis* метил-гирофорат. Орцинол-монометил-етар, орцинол, евернична киселина и уснинска киселина су најзаступљеније испарљиве компоненте ацетонског, етарског, етил-ацетатног и дихлорметанског екстракта лишаја *R. capitata* (редом). Најдоминантнији испарљиви конституенти лишаја *P. horizontalis* су метил-орселинат и додецил-акрилат (у етарским екстрактима талуса и апотеција), док је у свим испитиваним екстрактима лишаја *C. rangiformis* најзаступљенија рангиформна киселина. Лишај *P. horizontalis* има највећи садржај макро и микроелемената, изузев Na, Co, Pb и Si, чији је садржај највећи у лишају *R. capitata*. Жива је детектована само у лишају *R. capitata*. Ацетонски екстракти *R. capitata* и *C. rangiformis* показују умерену бактерицидну активност на Грам-позитивне бактерије. Грам-негативне бактерије резистентне су према свим испитиваним екстрактима. Највећи антиоксидативни капацитет према DPPH и ABTS методи има ацетонски екстракт апотеција лишаја *P. horizontalis*, а према CUPRAC методи екстракт *C. rangiformis*. Највећи садржај укупних фенола и вредност укупне редукционе моћи има ацетонски екстракт *R. capitata*. Испитивани екстракти у концентрацији од 2 µg/ml изазивају највеће смањење учесталости микронуклеуса, а најбољи ефекат међу њима показује екстракт талуса *P. horizontalis*. Сви ацетонски екстракти у концентрацији од 10 mg/ml поседују инхибирајући ефекат на активност ензима холинестеразе, а највећи степен инхибиције забележен је за талус лишаја *P. horizontalis*.

Датум прихватања теме, ДП: 03.04.2017.

Датум одбране, ДО:

Чланови комисије, КО: Председник: \_\_\_\_\_  
Члан: \_\_\_\_\_  
Члан: \_\_\_\_\_  
Члан: \_\_\_\_\_  
Члан, ментор: \_\_\_\_\_

Образац Q4.09.13 - Издање I



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, <b>ANO</b> :	
Identification number, <b>INO</b> :	
Document type, <b>DT</b> :	monograph
Type of record, <b>TR</b> :	textual / graphic
Contents code, <b>CC</b> :	doctoral dissertation
Author, <b>AU</b> :	Ivana S. Dimitrijević
Mentor, <b>MN</b> :	Gordana Stojanović
Title, <b>TI</b> :	Analysis of the chemical composition and biological activity of lichens <i>Ramalina capitata</i> (Ach.) Nyl., <i>Peltigera horizontalis</i> (Hudson) Baumg. and <i>Cladonia rangiformis</i> Hoffm.
Language of text, <b>LT</b> :	Serbian
Language of abstract, <b>LA</b> :	English
Country of publication, <b>CP</b> :	Serbia
Locality of publication, <b>LP</b> :	Serbia
Publication year, <b>PY</b> :	2021.
Publisher, <b>PB</b> :	author's reprint
Publication place, <b>PP</b> :	Niš, Višegradaska 33.
Physical description, <b>PD</b> : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	5 chapters, 118 pages, 132 references, 17 tables, 32 figures, 55 appendixes
Scientific field, <b>SF</b> :	Chemistry
Scientific discipline, <b>SD</b> :	Organic chemistry and Biochemistry
Subject/Key words, <b>S/KW</b> :	<i>Ramalina capitata</i> , <i>Peltigera horizontalis</i> , <i>Cladonia rangiformis</i> , HPLC, GC-MS, macro and microelements, antioxidant activity, antimicrobial activity, anticholinesterase activity, micronucleus test
<b>UC</b>	581.192 : 582.29(043.3) 581.5 : 582.29 (043.3)
Holding data, <b>HD</b> :	library
Note, <b>N</b> :	The research of this PhD thesis was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia, within the project OI 172047 and completed on the basis of a contract on the realization and financing of scientific research work by SRO, No. 451-03-9/2021-14/200124.

Abstract, <b>AB</b> :	<p>Within this doctoral dissertation, the chemical composition of acetone, ethyl acetate, ether and dichloromethane extracts was determined, as well as the antibacterial, antioxidant, genotoxic and anticholinesterase activity of acetone extracts of lichens <i>Ramalina capitata</i>, <i>Peltigera horizontalis</i> and <i>Cladonia rangiformis</i>. The content of twenty macro and microelements was determined. The most common component of the tested <i>R. capitata</i> extracts was evernic acid, and in lichen <i>C. rangiformis</i> atranorin. The main constituent of the examined extracts of apothecia and entire lichen <i>P. horizontalis</i> was tenuiorin, while methyl gyroforate was the dominant component of <i>P. horizontalis</i> talus. Orcinol-monomethyl ether, orcinol, evernic acid and usnic acid were the most common volatile components of acetone, ether, ethyl acetate and dichloromethane extracts of <i>R. capitata</i> (respectively). The most dominant volatile constituents of <i>P. horizontalis</i> were methyl orselinate and dodecyl acrylate (in talus and apothecia ether extracts), while rangiformic acid was the most abundant in all examined <i>C. rangiformis</i> extracts. Lichen <i>P. horizontalis</i> had the highest content of macro and microelements, except for Na, Co, Pb and Si, whose content was highest in <i>R. capitata</i>. Mercury was detected only in <i>R. capitata</i>. <i>Ramalina capitata</i> and <i>C. rangiformis</i> extracts showed moderate bactericidal activity against Gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria were resistant to the all tested extracts. The highest antioxidant capacity, according to DPPH and ABTS method, showed in apothecia acetone extract of <i>P. horizontalis</i>, and <i>C. rangiformis</i> extract according to CUPRAC method. The highest content of total phenols and the value of total reducing power was shown in <i>R. capitata</i> extract. The tested extracts at a concentration of 2 µg/ml caused the most pronounced reduction in the frequency of micronuclei, and the best effect among them was shown by the <i>P. horizontalis</i> talus. All acetone extracts at a concentration of 10 mg/ml had an inhibitory effect on the activity of the enzyme cholinesterase, and the highest inhibition was observed in the case of the <i>P. horizontalis</i> talus.</p>										
Accepted by the Scientific Board on, <b>ASB</b> :	03.04.2017.										
Defended on, <b>DE</b> :											
Defended Board, <b>DB</b> :	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="416 1608 624 1653">President:</td> <td data-bbox="624 1608 1481 1653"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="416 1653 624 1697">Member:</td> <td data-bbox="624 1653 1481 1697"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="416 1697 624 1742">Member</td> <td data-bbox="624 1697 1481 1742"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="416 1742 624 1787">Member</td> <td data-bbox="624 1742 1481 1787"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="416 1787 624 1836">Member, Mentor:</td> <td data-bbox="624 1787 1481 1836"></td> </tr> </table>	President:		Member:		Member		Member		Member, Mentor:	
President:											
Member:											
Member											
Member											
Member, Mentor:											

*Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena”, (evidencioni broj OI 172047, rukovodilac projekta prof. dr Gordana Stojanović).*

*Neizmerno sam zahvalna svom mentoru Gordani Stojanović na ukazanom poverenju, pomoći i podršci za vreme doktorskih studija, kao i na svemu što sam naučila od nje tokom izrade doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem svojim dragim profesorima, Olgi Jovanović, Violeti Mitić, Aleksandri Đorđević, Snežani Tošić, Andriji Šmelcerović i Goranu Petroviću, koji su doprineli realizaciji ovog rada, i dali stručnu pomoć pri analizi hemijskog sastava, određivanju multielementnog sadržaja, antimikrobne i antioksidativne aktivnosti. Podjednako se zahvaljujem Violeti Mitić na sakupljanju lišajevskog materijala.*

*Posebnu zahvalnost dugujem Vesni Stankov Jovanović pod čijim rukovodstvom je odrađen eksperiment antiholinesterazne aktivnosti u Opštoj bolnici u Pirotu.*

*Ispitivanje uticaja na učestalost mikronukleusa sprovedeno je u laboratorijama Javnog preduzeća “Nuklearni objekti Srbije”. Veliko hvala dr Miroslavi Stanković na eksperimentalnim podacima i pomoći prilikom diskusije rezultata ispitivanja.*

*Takođe se zahvaljujem i profesoru Bojanu Zlatkoviću sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, na sakupljanju i identifikaciji lišajevskog materiala.*

*Mojoj dragoj kolegici i kumi Ivani Zlatanović zahvaljujem se na druženju, timskom radu, velikoj pomoći i podršci tokom svih godina studija.*

*Naposletku, od srca se zahvaljujem svojoj porodici, suprugu Vladimiru i ćerki Nedi na nesebičnoj podršci, razumevanju, strpljenju i ljubavi. Hvala vam što ste verovali u mene!*



## Skraćenice

AAE – *Ascorbic acid equivalent* (Ekvivalent askorbinske kiseline)

ABTS – 2,2-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

AMDIS – *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*

(Automatizovani sistem za identifikaciju i dekonvoluciju masenih spektara)

APCI – *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization* (Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom)

ATCC – *American Type Culture Collection* (Američka kolekcija kultura sojeva)

BuTC – Butiriltioholin

CBMN – *Cytokinesis-blocked micronucleus assay* (Metoda blokade citokineze mikronukleusa)

CBPI – *Cytokinesis-block proliferation index* (Citokinezis blok proliferacioni indeks)

CI – *Chemical Ionisation* (Hemijska jonizacija)

CID - *Charge Injection Device*

CoA – Koenzim A

CUPRIC - *Cupric Reducing Antioxidant Capacity* (Antioksidativni kapacitet redukcije bakra)

DAD – *Diode-Array Detector* (Detektor na bazi diodnog niza)

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

DPPH – 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil

DTNB – Ditio-nitro benzoeva kiselina

ECD – *Electron capture detector* (Elektronsko-apsorpcioni detektor)

EI – *Electron Ionisation* (Jonizacija elektronima)

ESI – *Electrosprey Ionisation* (Jonizacija elektrosprejom)

FAB – *Fast Atom Bombardment* (Bombardovanje brzim atomima)

FID – *Flame Ionisation Detector* (Plameno-jonizujući detektor)

FPD – *Flame photometric detector* (Plameno-fotometrijski detektor)

FTIR – *Fourier-transform infrared spectrometer* (Spektrometar na bazi infracrvene Furijeove transformacije)

G- – Gram-negativna bakterija

G+ – Gram-pozitivna bakterija

GAE – *Gallic acid equivalent* (Ekvivalent galne kiseline)

GC-MS – *Gas Chromatography-Mass spectrometry* (Gasna hromatografija kuplovana sa masenom spektrometrijom)

HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography* (Tečna hromatografija pod visokim pritiskom)

IC<sub>50</sub> – *Half Maximal Inhibitory Concentration* (Polovina maksimalne inhibitorne koncentracije)

ICP-OES – *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry* (Optičko emisijska spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom)

IUPAC – *International Union for Pure and Applied Chemistry* (Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju)

LOD – *Limit of Detection* (Granica detekcije)

*m/z* – *Mass to Charge Ratio* (Odnos mase i naelektrisanja jona)

MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* (Matriksom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija)

MMC – Mitomicin C

MN – Mikronukleus

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Američki Nacionalni komitet za kliničke laboratorijske standarde)

NCTC – *National Collection of Type Cultures* (Nacionalna kolekcija kultura sojeva)

PID – *Photo-ionization detector* (Foto-jonizujući detektor)

RI – *Retention Index* (Eksperimentalni retencioni indeks)

RL – *Retention Index from Literature* (Literaturni retencioni indeks)

SD - Standardna devijacija

SE – Suvi ekstrakt

TCD – *Thermal conductivity detector* (Detektor termalne provodljivosti)

TE – *Trolox equivalent* (Ekvivalent Troloksa)

TIC – *Total Ion Current* (Ukupna jonska struja)

TID – *Thermionic ionization detector* (Termalno-jonizujući detektor)

TOF – *Time of flight* (Analizator sa vremenom preletanja)

TPC – *Total Phenolic Content* (Ukupni sadržaj fenola)

TRP – *Total Reducing Power* (Ukupna redukciona moć)

UV – *Ultra Violet* (Ultraljubičasto zračenje)

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKE OSNOVE.....	4
2.1. Filogenetsko stablo i morfologija lišajeva .....	4
2.2. Lišajevske supstance, biosinteza i struktura.....	7
2.3. Instrumentalne metode analize: HPLC, GC-MS, ICP-OES.....	13
2.3.1. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) .....	13
2.3.2. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) .....	16
2.3.3. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) .....	19
2.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita .....	21
2.5. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti.....	22
2.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ispitivanih lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita .....	23
2.7. Genotoksična aktivnost ekstrakata ispitivanih lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita .....	24
2.8. Uticaj ekstrakata ispitivanih lišajeva na aktivnost holinesteraze .....	25
2.9. Ostale biološke aktivnosti ekstrakata ispitivanih lišajeva i njihovih najzastupljenijih konstituentata .....	26
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	29
3.1. Aparati .....	29
3.2. Reagensi i rastvori .....	29
3.3. Lišajevski materijali .....	31
3.4. Priprema ekstrakata .....	33
3.5. HPLC analiza .....	33
3.6. GC-MS analiza.....	33
3.7. ICP-OES analiza .....	34
3.7.1. Karakteristike ICP spektrometra serije iCAP 6000 .....	35
3.8. Antioksidativna aktivnost acetonskih ekstrakata ispitivanih lišajeva .....	35
3.8.1. Određivanje „scavenging“ antioksidativnog slobodno-radikalskog kapaciteta prema DPPH radikalu.....	35

3.8.2. Određivanje "scavenging" antioksidativnog slobodno radikalskog kapaciteta prema ABTS radikalima.....	36
3.8.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem ukupne redukcijske moći (TRP metoda, total reducing power).....	36
3.8.4. Određivanje ukupnog sadržaja fenola (TPC, total phenolic content) .....	37
3.8.5. CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) analiza.....	37
3.9. Određivanje antimikrobne aktivnosti acetonskih ekstrakata ispitivanih lišajeva .....	37
3.10. Ispitivanje uticaja acetonskih ekstrakata na formiranje mikronukleusa u limfocitima humane krvne plazme.....	38
3.11. Ispitivanje uticaja acetonskih ekstrakata na aktivnost serumske holinesteraze.....	39
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	41
4.1. HPLC analiza acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakata odabarnih vrsta lišajeva.....	41
4.2. GC-MS analiza acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakata odabarnih vrsta lišajeva.....	49
4.3. ICP-OES analiza .....	62
4.4. Antioksidativna aktivnost .....	66
4.5. Antimikrobna analiza .....	71
4.6. Mikronukleusni test.....	74
4.7. Uticaj acetonskih ekstrakata odabranih vrsta lišajeva na aktivnost holinesteraze.....	77
5. ZAKLJUČAK.....	80
6. PRILOG .....	96
7. BIOGRAFIJA.....	119
8. BIBLIOGRAFIJA.....	120

# 1. UVOD

Lišajevi (lat. *lichenes*) predstavljaju jedinstvenu simbiotsku zajednicu sastavljenu od predstavnika dva različita carstva: gljiva (mikobiont) i algi (fotobiont). Ponekad umesto algi ili zajedno sa njima prisutne su i neke modroz zelene bakterije (cijanobakterije). Simbiotski odnosi lišaju daju specifične morfološke, fiziološke i ekološke osobine tako da se pojedinačni uticaji i karakteristike algi i gljiva gube. Oba člana u ovoj simbiozi imaju koristi i međusobno se dopunjuju. Tako mikobionti daju lišajevima oblik i izgled (često doprinose 80-90 % biomase lišaja), vrše zaštitu od isušivanja snabdevajući algu vodom, štite od sunčeve svetlosti, i apsorbiraju mineralne nutrijente iz podloge (tlo, drveće, stena) na kojima se lišajevi nalaze, dok fotobiont sintetizuje organske hranjive materije kao proizvode fotosinteze (u prisustvu cijanobakterije, i azot dobijen azotofiksacijom) (Nash i saradnici, 2002).

Lišajevi proizvode niz sekundarnih metabolita, tzv. „lišajevske supstance“, uglavnom iz metabolizma gljiva (Brennan i saradnici, 2009). Lišajevske supstance su ekstracelularni molekuli male molekulske mase, obično nerastvorne u vodi, ali se mogu izolovati pomoću organskih rastvarača. Ove komponente najčešće čine od 0,1 do 10 % suve mase talusa a ponekad dostižu čak 30 % (Kosanić i saradnici, 2010). Metaboliti lišajeva se mogu podeliti u dve grupe: primarni i sekundarni. Primarni metaboliti (proteini, lipidi, ugljeni hidrati i druga organska jedinjenja) su odgovorni za metabolizam i strukturu lišajeva, dok su sekundarni metaboliti uglavnom mali, ali složeni molekuli, koji uključuju alifatične, cikloalifatične, aromatične i terpenske komponente (depsidi, depsidoni, dibenzofurani, ksantoni i terpenški derivati). Depsidi, depsidoni, tridepsidi i tetradepsidi su najbrojnija klasa metabolita u lišajevima (Manojlović i saradnici, 2012<sup>a</sup>).

Određivanje hemijskog sastava sekundarnih metabolita lišajeva predstavlja predmet interesovanja mnogih istraživačkih timova, koji se takođe fokusiraju i na ispitivanje bioloških aktivnosti koje lišajevi poseduju, uključujući: antibakterijske (Ingólfssdóttir i saradnici, 1998), antivirusne (Neamati i saradnici, 1997), antioksidativne (Hidalgo i saradnici, 1994), analgetičke, antipiretičke (Okuyama i saradnici, 1995), citotoksične, fungicidne, herbicidne, insekticidne (Dayan i Romagni, 2001), i mnoge druge. Halici i saradnici (2011) ispitivali su gastroprotektivni i antioksidantni efekat ekstrakta *Ramalina capitata*, dok su Cansaran i saradnici (2007) dokazali antimikrobnu aktivnost acetonskog ekstrakta istog lišaja, koja se može pripisati usninskoj kiselini prisutnoj u lišaju. Dokazano je antigenotoksično i antioksidativno svojstvo ekstrakta dobijenog iz vrste lišaja *Peltigera horizontalis* (Nardemir i

saradnici, 2015). Bézivin i saradnici (2003) pokazali su da ekstrakti lišaja *Cladonia rangiformis* poseduju izraženu i veoma selektivnu citotoksičnost, dok su Açıkgöz i saradnici (2013) ustanovili antifungalni efekat na *Candida albicans*.

Poznato je da biološke aktivnosti lišajeva imaju terapijski efekat na razne bolesti i stanja (bolesti digestivnog trakta, dijabetes, opekotine, veliki kašalj, tuberkuloza, kožne bolesti, kardiovaskularni poremećaji) i u tradicionalnoj medicini mnogih zemalja koriste se za lečenje još od davnina (Richardson, 1991). *Peltigera aphthosa* predstavlja vrstu lišajeva koja se pokazala kao efikasna za lečenje čireva koji teško zarastaju, opekotina i tuberkuloze (Turner i saradnici, 1983; Wang i saradnici, 2001). *Ramalina bourgeana* se upotrebljava kao diuretik za razbijanje kamena u bubregu (González i saradnici, 1995). *Cladonia pyxidata* je cenjeni narodni lek koji se koristi se za lečenje velikog kašlja i kao antipiretik (Bown, 2001). *Peltigera canina* se jede u Indiji kao lek za tegobe jetre (Saklani i Upreti, 1992). Zanimljivo je da su u oblasti Velikih jezera u Severnoj Americi novorođene bebe kupane u vodi u kojoj je prethodno bio prokuvan lišaj *C. rangiferina* (Vogel, 1970).

Neke vrste lišajeva su bogate uljima i derivatima depsida, tako da je komercijalno sakupljanje ovih vrsta za potrebe industrija parfema veoma aktuelno (Joulain i Tabacchi, 2009<sup>a</sup>). Lišajevi roda *Ramalina* (*R. farinacea*, *R. fraxinea* i *R. pollinaria*) korišćene su za pravljenje parfema i u proizvodnji kozmetike, najčešće za proizvodnju pudera za kosu (Llano, 1951; Uphof, 1959; Richardson, 1974).

Lišajevi ponekad čine deo ljudske ishrane, tako što se odgovarajućim načinom priprema talus koji je jestiv, ali je najčešće bezukusan ili gorkog ukusa. *Cladonia* vrste se od davnina na Aljasci koriste za ishranu ljudi (Kari, 1987). Gorki sirupi napravljeni od lišajeva *C. mitis*, *C. rangiferina* i *R. fraxinea* primenjivani su za proizvodnju žestokih alkoholnih pića ili kao podloge za uzgajanje prehrambenog kvasca u Rusiji i Švedskoj (Llano, 1956). Lišajevi su takođe i važan izvor hrane za životinje arktičkih predela. Tako se u Kanadi tokom zime irvasi (karibui) hrane lišajem *C. rangiferina*, koji je poznat i kao „irvasova mahovina“ (Bergerud, 1972).

Dok se alge obično lako prepoznaju po jarko travnato zelenoj boji i cijanobakterije čije se boje kreću od zelene do plavo-zelene ili tamnoplave, lišajeve karakterišu razne neverovatne boje, od gotovo bele, sive ili smeđe nijanse, do briljantno crvene, narandžaste ili žute boje. Različite boje lišajeva rezultat su akumulacije specifičnih pigmenata, soli i mnogobrojnih lišajevskih kiselina u njihovom talusu. Kao primer, žuto-zelena boja često odražava nakupljanje usninske kiseline; svetlo žuta – akumulaciju vulpinske kiseline ili rizokarpinske kiseline; i

narandžasta – akumulaciju antrahinona (Hauck i saradnici, 2009). Interesantna je činjenica da je atranorin okarakterisan kao žuto fluorescentno jedinjenje (Rao i LeBlanc, 1965). Lišajevi se upotrebljavaju u industriji boja i u tekstilnoj industriji za bojenje tkanina (Ferreira i saradnici, 2004). Kao izvor za bojenje vune u tekstilnoj indutriji korišćeni su lišajevi: *C. rangiferina*, *C. fimbriata* i *P. canina* (za crvenu boju gvožđa), *C. coccifera* (za crveno-ljubičastu boju), *C. gracilis* (za pepeljasto zelenu), *R. calicaris* (za žuto-crvenu boju), *R. cuspidata* i *R. farinacea* (za svetlo-braon boju), i *R. scopulorum* (za žuto-braon do crveno-braon boje) (Uphof, 1959). Takođe i druge vrste lišajeva roda *Ramalina* su izvor žute boje za bojenje tkanina (de Mayolo, 1989).

Važnost lišajeva se ogleda i u tome što su veoma osetljivi na kvalitet vazduha, odnosno njegovog zagađenja. Povećana koncentracija štetnih materija u lišajevima može dovesti do narušavanja simbioze između fotobionta i mikobionta i odumiranja lišaja. Tako, prisustvo lišaja u nekom predelu govori o čistoći njegovog vazduha, pa se neke vrste lišajeva već niz godina koriste kao bioindikatori za monitoring i zaštitu životne sredine (Garty, 2001). Takođe, lišajevi imaju primenu u poljoprivredi kao sredstva za zaštitu od insekata i biljojeda (Huneck i Yoshimura, 1996).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja hemijskog sastava i bioloških aktivnosti lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis*, cilj ove doktorske disertacije bio je:

- Priprema acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakata odabranih vrsta lišajeva;
- Određivanje njihovog hemijskog sastava pomoću HPLC i GC-MS metode;
- Određivanje sadržaja odabranih elemenata u lišajevskom materijalu pomoću ICP-OES metode;
- Ispitivanje antioksidativne aktivnosti acetonskih ekstrakata;
- Ispitivanje antibakterijske aktivnosti acetonskih ekstrakata;
- Određivanje uticaja acetonskih ekstrakata na formiranje mikronukleusa u limfocitima humane krvne plazme;
- Ispitivanje uticaja acetonskih ekstrakata na aktivnost serumske holinesteraze.

# 1. TEORIJSKE OSNOVE

## 1.1. Filogenetsko stablo i morfologija lišajeva

Smatra se da su lišajevi najstariji kolonizatori kopnenih staništa na Zemlji, što je potvrđeno na osnovu fosilnih ostataka od pre 400-600 miliona godina (Taylor i saradnici, 1995). Trenutno naseljavaju preko 10 % površine zemlje i važni su sastav mnogih ekosistema. Lišajevi rastu na steni, kori drveća, lišću, neplodnom tlu, suočeni sa ekstremnim temperaturama, zračenjem i nedostatkom vlage. Rastu veoma sporo, svega nekoliko milimetara godišnje. Imaju prilično dug životni vek i do nekoliko hiljada godina. Zona tundre se smatra carstvom lišajeva (de Vries i de Vries, 2008). Lišajevi imaju sposobnost rehidratacije, jer kada izgubi puno vode prelazi u stanje anabioze (prividna obamrlost), pri čemu talus postaje suv i lako lomljiv, ali se njegove životne funkcije normalizuju već posle prve kiše (Molnár i Farkas, 2010).

Svaka vrsta lišaja karakteriše se određenom vrstom alge i određenom vrstom gljive. Od algi, uglavnom učestvuju zelene alge (Chlorophyta), do 80 %, i malobrojni predstavnici modrozelenih algi (Cyanobacteriophyta), a od gljiva uglavnom vrste iz podrazdela Ascomycotina i mali broj vrsta Basidiomycotina. Kod više od 90 % lišajeva, fotobionti su iz rodova *Trebouxia* i *Trentepohlia* (Chlorophyta) i *Nostoc* i *Scytonema* (Cyanophyta) (Lücking i saradnici, 2009).

Vegetativno telo lišaja je talus i na osnovu njegove morfologije lišajeva možemo podeliti na koraste, listaste i žbunaste. Korast tip lišajeva (krustozni) ima jednostavnu građu i celom svojom površinom naleže na podlogu i vrlo se teško može odvojiti od nje. Najveći broj lišajeva pripada ovoj grupi i uglavnom raste na kori drveća i stenama. Lišajevi čiji je talus u obliku lisne ploče sa režnjevima pripadaju listastom tipu (foliozni). Kod ovog tipa razlikuje se gornja i donja strana a talus je za podlogu pričvršćen posebnim hifama grupisanim u snopove - tzv. rizinije, ili pojedinačnim hifama – rizoidima. Morfološki su složenije građe i filogenetski su mlađa grupa od korastih lišajeva. Žbunasti lišajevi (frutikozni) su morfološki najsloženiji tip sa razgranatim i žbunastim talusom, koji visi sa podloge za koju je lagano pričvršćen. Najčešće rastu u brdskim i planinskim predelima i filogenetski su najmlađa grupa lišajeva. Osim ova tri glavna tipa, postoji i čitav niz prelaznih morfoloških formi talusa (Goward i saradnici, 1994).

Lišajevi se razmnožavaju na više načina. Najčešće vegetativnim (regenerativnim) putem kada se iz svakog komadića talusa lišaja, koji sadrži i algalnu i fungalnu komponentu, razvija nova jedinka. Lišajevi se vegetativno mogu razmnožavati i pomoću posebnih struktura koje se formiraju na ili u talusu – izidije i soredije, čija je funkcija regeneracija ili rasejavanje



talusa na druge lokalitete, najčešće nošene vetrom. Soredije mogu biti raspoređene i na posebnim formacijama – soralijama, od kojih se odvajaju i lako raspršuju. Samo fungalnu komponentu lišaja karakteriše polno razmnožavanje koje se obavlja obrazovanjem plodonosnih tela, u najvećem broju slučajeva – apotecija (Nash, 1996).

*Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. je zelenkasto-sivi frutikozni lišaj koji raste u obliku spljoštenih režnjeva nalik resama. Površina režnja je uzdužno prugasta sa izduženim jamama, dok se granulirane soralije nalaze na zakrivljenim vrhovima režnjeva. Retko je prisustvo apotecija. Rastu na kori drveta i stenama, i dostižu visinu od 1-2 cm (Smith i saradnici, 2009).

**Tabela 1.** Taksonomija lišaja *R. capitata* (Ach.) Nyl.

Taksonomske kategorije	Taksoni
Carstvo (Regnum)	Fungi
Razdeo (Divisio)	Ascomycota
Klasa (Classis)	Lecanoromycetes
Red (Ordo)	Lecanorales
Porodica (Familia)	Ramalinaceae
Rod (Genus)	<i>Ramalina</i> Ach.
Vrsta (Species)	<i>Ramalina capitata</i> (Ach.) Nyl.



**Slika 1.** *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl.

(Lokalitet: Stara Planina, Babin zub;  
fotografisala: Ivana Dimitrijević)

Rod *Peltigera* spada u foliozni tip lišajeva, obično poznat kao „pasiji lišaj“. Najčešće rastu na zemlji među mahovinama, ređe na drveću i stenama. Većina vrsta ima cijanobakteriju *Nostoc* kao dominantnog fotobionta (Martinez i saradnici, 2003). Talus lišaja *P. horizontalis* je prilično širok i kružnog oblika, prečnika od 5 do 10 cm. Režnjevi su spljošteni i valoviti. Gornja površina talusa, sjajna i glatka, može biti sive, smeđe ili plavo-sive nijanse, dok je donja površina bele boje, bez korteksa (za razliku od ostalih folioznih lišajeva) i često sa isprepletenim hifama sivo-crne boje. Apotecije su zaobljene (3-6 mm), nalik spljoštenim diskovima, koji se drže horizontalno na krajevima režnjeva (Nash i saradnici, 2004).

**Tabela 2.** Taksonomija lišaja

*P. horizontalis* (Huds.) Baumg.

Taksonomske kategorije	Taksoni
Carstvo (Regnum)	Fungi
Razdeo (Divisio)	Ascomycota
Klasa (Classis)	Lecanoromycetes
Red (Ordo)	Peltigerales
Porodica (Familia)	Peltigeraceae
Rod (Genus)	<i>Peltigera</i> Willd.
Vrsta (Species)	<i>Peltigera horizontalis</i> (Huds.) Baumg.



**Slika 2.** *Peltigera horizontalis* (Huds.) Baumg.

(Lokalitet: Suva planina;  
fotografisao: Bojan Zlatković)

**Tabela 3.** Taksonomija lišaja

*C. rangiformis* Hoffm.

Taksonomske kategorije	Taksoni
Carstvo (Regnum)	Fungi
Razdeo (Divisio)	Ascomycota
Klasa (Classis)	Lecanoromycetes
Red (Ordo)	Lecanorales
Porodica (Familia)	Cladoniaceae
Rod (Genus)	<i>Cladonia</i> P. Browne
Vrsta (Species)	<i>Cladonia rangiformis</i> Hoffm.



**Slika 3.** *Cladonia rangiformis* Hoffm.

(Lokalitet: Suva planina;  
fotografisao: Bojan Zlatković)

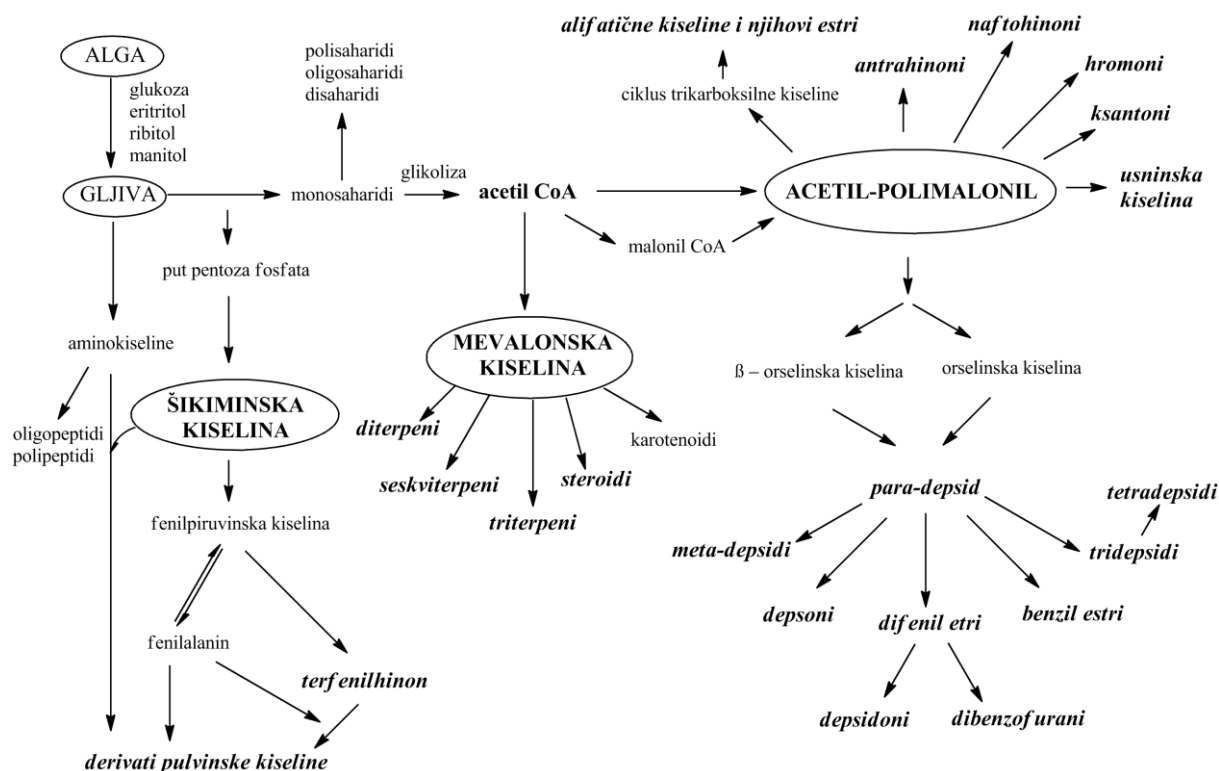
*Cladonia rangiformis* je po morfologiji žbunast (frutikozan) lišaj, sivo-bele ili sivo-zelene boje. Ovu vrstu odlikuje dimorfan talus koji je izgrađen od horizontalnog primarnog talusa (skvamozne nalik krljuštima) i vertikalnog sekundarnog talusa (podecije). Podecije koje se formiraju na primarnom talusu, bogato su razgranate i na površini se mogu uočiti sivo-zelene ili zelene mrlje tako da izgleda pegasto (kao telo žirafe). Na vrhovima grana mogu se retko naći tamnosmeđa i veoma sitna plodonosna tela. Obično rastu na zemlji i travnjacima, mogu se naći i u oblastima dina (Smith i saradnici, 2009).

## **1.2. Lišajevske supstance, biosinteza i struktura**

Prva hemijska ispitivanja sprovedena na talusima lišaja izveo je Nilander 1860-ih (Vitikainen, 2009), tako što je dodavanjem hemijskih reagensa direktno na talus lišaja uočio karakteristične promene boje i zaključio da je to posledica prisustva različitih supstanci u lišaju. Zatim su Hesse i Zopf sprovedli prvo obimnije hemijsko ispitivanje lišajeva u kome su okarakterisali preko 150 jedinjenja lišaja (Zopf, 1907). Detaljnijim radom Asahina i Shibata (1954), postavili su temelj za dalja ispitivanja razrešivši strukturno mnoge uobičajene metabolite lišajeva.

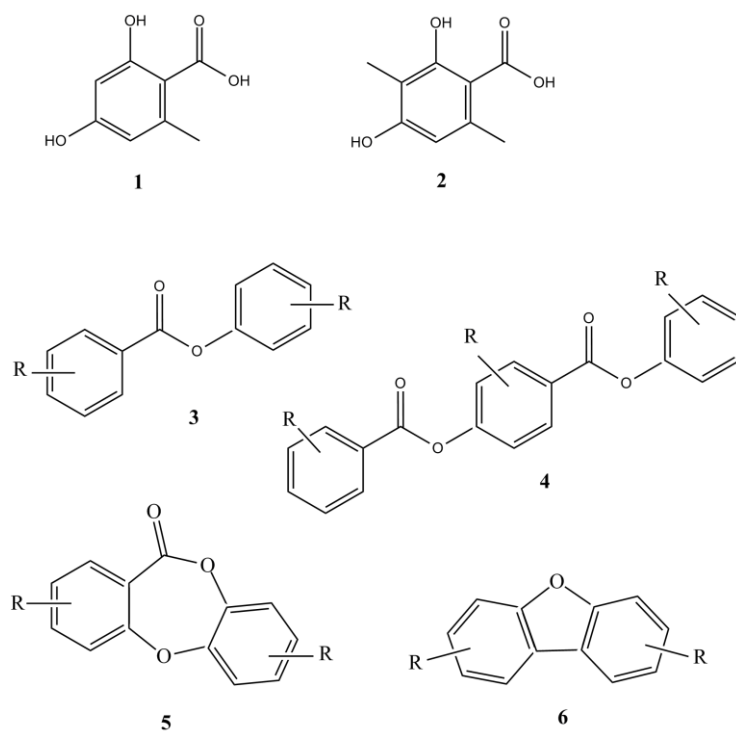
Metaboliti lišaja mogu se podeliti u dve glavne grupe: primarni metaboliti (intracelularni) i sekundarni metaboliti (ekstracelularni). Uobičajeni intracelularni metaboliti u lišajevima uključuju aminokiseline, proteine, polisaharide, karotenoide, vitamine, poliole i druge organske komponente koje su esencijalne za njihov rast i razvoj. Locirani su u ćelijskim zidovima i protoplastima i sintetišu ih i gljive i alge. Većina ekstracelularnih metabolita izolovanih iz lišajeva su specifična organskih jedinjenja koja se sintetišu kao sekundarni metaboliti gljiva, i ne deponuju se unutar ćelija već na površini hifa.

Raznolikost i dominacija proizvedenih sekundarnih metabolita prisutnih unutar različitih vrsta lišajeva rezultat su odgovarajućih biosintetskih puteva. Sekundarni metaboliti se generalno proizvode jednim od tri glavna biosintetska puta – putevima acetil-polimalonila, šikiminske kiseline i mevalonske kiseline (Slika 4). Proizvedena jedinjenja modifikuju se različitim enzimima tokom biosinteze, što rezultira veoma raznovrsnom kolekcijom molekula i u strukturi i u funkciji (Deduke i saradnici, 2012).



**Slika 4.** Biosintetski put nastajanja lišajevskih supstanci (prerađeno iz Elix,1996)

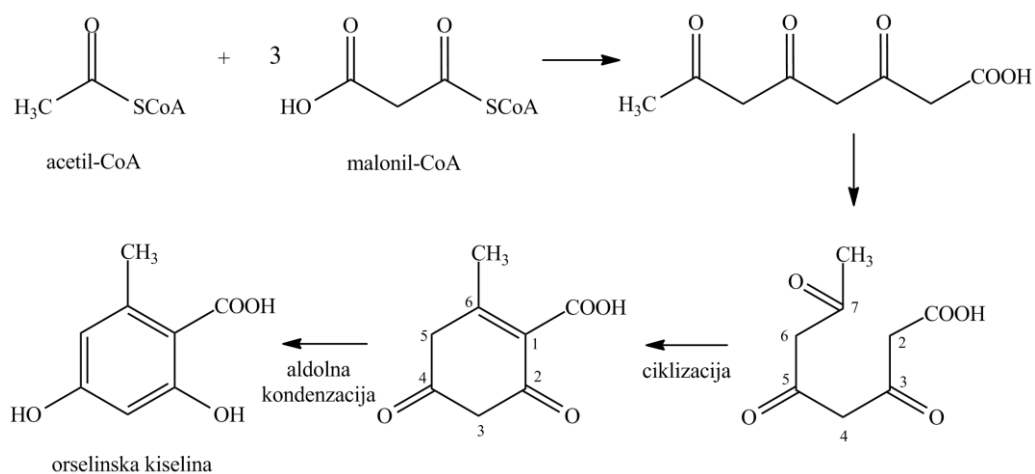
Većina sekundarnih metabolita prisutnih u lišajevima sintetiše se iz acetil-polimalonatnog puta, a ređe metaboličkim putevima preko šikiminske i mevalonske kiseline (Elix, 1996). Aromatična jedinjenja (depsidi, depsidoni, dibenzofurani, depsoni i usninska kiselina), proizvedena iz acetil-polimalonatnog biosintetskog puta, prilično su zastupljena među sekundarnim metabolitima koja nastaju vezivanjem dve ili tri fenolne jedinice (orcinol ili  $\beta$ -orcinol) estraskom, etarskom i C-C vezom, a daljom modifikacijom sintetišu se raznovrsne lišajevske supstance. Ova aromatična jedinjenja nastaju mehanizmom koji je svojstven samo lišajevima. Ostali metaboliti dobijeni poreklom iz acetil-polimalonatnog puta su policiklična aromatična jedinjenja (hromoni, ksantoni i antrakinoni) nastala unutrašnjom ciklizacijom dužih poliketidnih lanaca. Ovakvi molekuli se mogu naći i kod gljiva koje ne ulaze u sastav lišajeva, kao i kod viših biljaka (Ranković i Kosanić, 2015). Na Slici 5 predstavljene su hemijske strukture fenolnih monomera i najzastupljenijih klasa sekundarnih metabolita proizvedenih iz acetil-polimalonatnog puta.



**Slika 5.** Hemijske strukture fenolnih jedinica i najzastupljenijih klasa sekundarnih metabolita lišajeva sintetisani putem acetil-polimalonila: 1 – orselinska kiselina; 2 –  $\beta$ -orselinska kiselina; 3 – didepsid; 4 – tridepsid; 5 – depsidon; 6 – dibenzofuran

Orselinska kiselina kao slobodna do sada nije pronađena u lišajevima, jer je previše nestabilna. Do stabilizacije dolazi stvaranjem depsida ili se podvrgava dekarboksilaciji da bi se dobio orcinol (Seshadri, 1944). Biosinteza orselinske kiseline (Slika 6) uključuje sastavljanje jednog molekula acetil-CoA i tri molekula malonil-CoA u tetraketid koji se zatim ciklizuje povezivanjem C2 i C7, a potom dolazi do nespecifične i neenzimske aldolne kondenzacije na C3 i C5 do konačne strukture (Woo i saradnici, 1989).





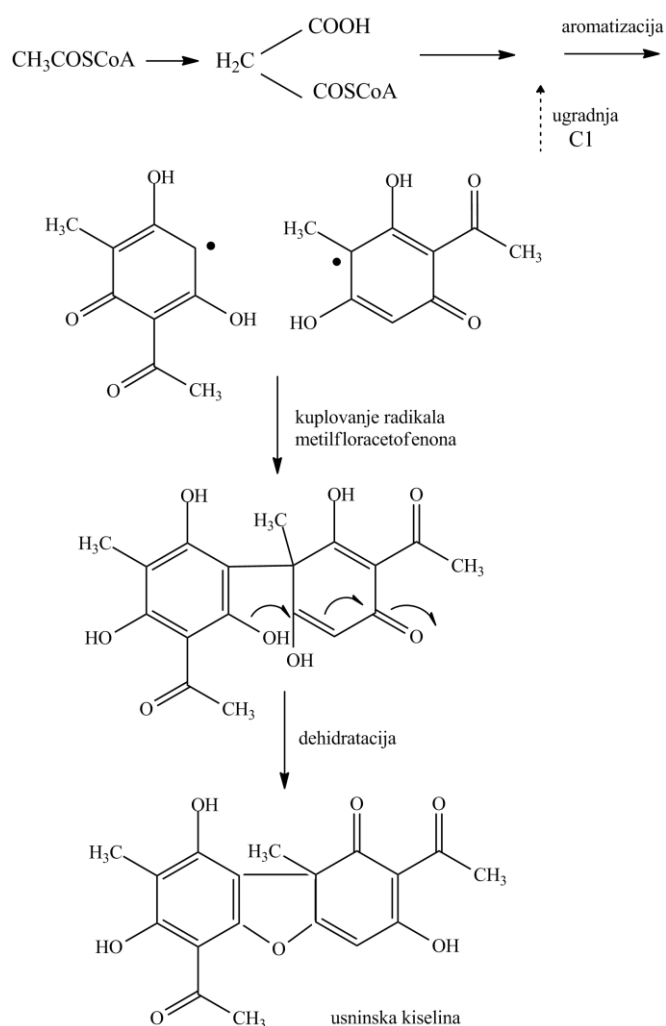
**Slika 6.** Biosinteza orselinske kiseline

Najzastupljenije klase metabolita lišaja su depsidi i depsidoni. Ako se prilikom biosinteze depsida karboksilna grupa jedne jedinice povezuje sa hidroksilnom grupom koja je u *para* položaju druge karboksilne kiseline, takve esterifikacije vode do stvaranja *para*-depsida. Suprotno, ako se estarska veza nagradi na prvu jedinici u položaju *meta* u odnosu na karboksilnu grupu drugog prstena, nastaje *meta*-depsid. *Para*-depsid ima ključnu ulogu u biosintezi aromatičnih lišajevskih supstanci tako što predstavlja biosintetski intermedijer ili prekursor (Elix i saradnici, 1987).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja dokazano je da se *para*- i *meta*-depsidi mogu istovremeno naći u istom organizmu. Iz *R. americana* izolovana su dva usko povezana depsida, *para*-depsid subdivarikatska kiselina i *meta*-depsid subsekikaična kiselina (Culbertson i saradnici, 1990). Najpoznatiji *para*-depsid atranorin nastao kao derivat  $\beta$ -orcinola detektovan je u lišaju *C. rangiformis* (Yoshimura i saradnici, 1994; Huneck i saradnici, 2004). Atranorin karakteriše širok spektar bioloških aktivnosti. U njegovoj biosintezi osim metil-3-orselinata učestvuje i hematofil aldehyd koji nastaje oksidazom i dehidrogenazom metil-3-orselinata (Studzińska-Sroka i saradnici, 2017).

Vrstu *R. capitata* karakteriše prisustvo dibenzofurana usninske kiseline, koja je predmet interesovanja mnogih istraživanja jer je jedna od biološki najaktivnijih lišajevskih jedinjenja (Cansaran i saradnici, 2007). Usninska kiselina je žuti pigment i kao proizvod sekundarnog metabolizma gljiva javlja se u dva enantiomerna oblika koja se razlikuju u orijentaciji metil grupe u položaju 9b. Oba optička izomera, (-)-usninska kiselina i (+)-usninska kiselina, ne mogu se istovremeno naći u istom organizmu (Ranković i Kosanić, 2015). U procesu biosinteze usninske kiseline dolazi do stvaranja metilfloracetofenona, uz ugradnju C1 fragmenta pre

aromatizacije poliketida (Slika 7). Sledeći koraci uključuju stereospecifično oksidativno fenolno spajanje dve metilfloracetofenonske jedinice da bi se dobila hidratizirana usninska kiselina i na kraju dehidratacijom dolazi do stvaranja etarske veze (Ingólfssdóttir, 2002). Osim u rodu *Ramalina*, usninska kiselina može se često naći i u rodu *Cladonia* (Proksa i saradnici, 1996). Strukturni izomer usninske kiseline – izousninska kiselina poznata je samo u rodu *Cladonia*, ali opsežna istraživanja o distribuciji ovog metabolita još uvek nisu zabeležena (Ranković i Kosanić, 2015).

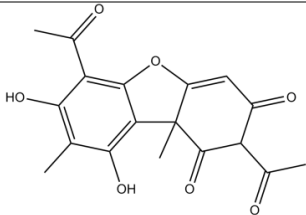
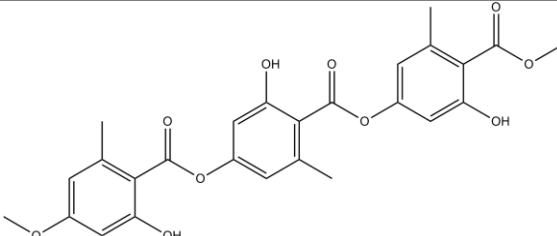
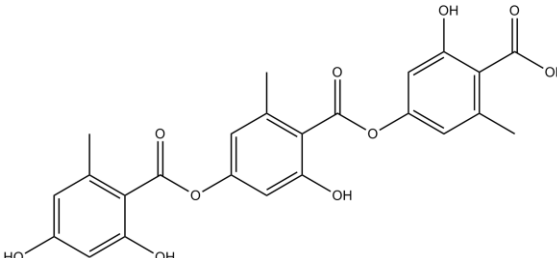
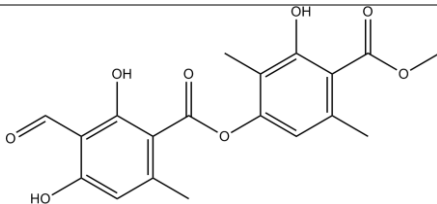
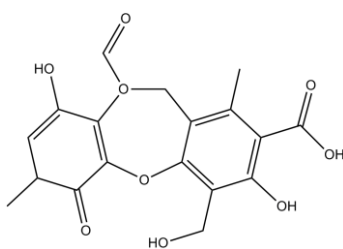


**Slika 7.** Biosinteza usninske kiseline (Taguchi i saradnici, 1969)

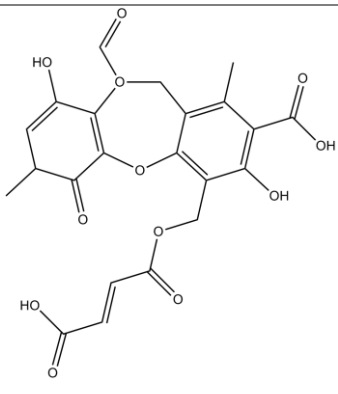
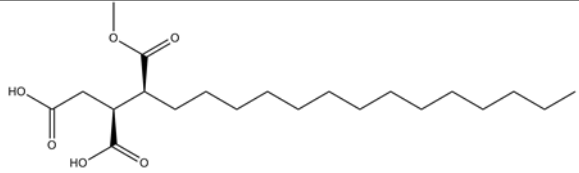
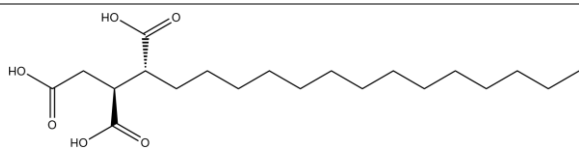
*Peltigera horizontalis* proizvodi metabolite iz grupe tridepsida kao što su tenuiorin i giroforna kiselina (Goward i saradnici, 1995). Ova jedinjenja u svojoj hemijskoj strukturi sadrže tri monomera orselinske kiseline koja su povezana estraskim vezama. Na osnovu dosadašnjih

istraživanja, osim atranorina, *C. rangiformis* se karakteriše sadržajem depsidona – protocetrarične i fumarprotocetrarične kiseline, kao i alifatičnih kiselina – norrangiformne kiseline i njenog monometil-estra rangiformne kiseline (Pino-Bodas i saradnici, 2017).

**Tabela 4.** Hemijske strukture jedinjenja identifikovanih iz vrsta lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis*

Trivijalno ime	Hemijska struktura	IUPAC ime
Usninska kiselina ( <i>usnic acid</i> )		2,6-diacetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetildibenzofuran-1,3-dion
Tenuiorin ( <i>tenuiorin</i> )		[3-hidroksi-4-(3-hidroksi-4-metoksikarbonil-5-metilfenoksi)karbonil-5-metilfenil] 2-hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoat
Giroforna kiselina ( <i>gyrophoric acid</i> )		4-[4-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoil)oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoil]oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoeva kiselina
Atranorin ( <i>atranorin</i> )		(3-hidroksi-4-metoksikarbonil-2,5-dimetilfenil) 3-formil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat
Protocetrarična kiselina ( <i>protocetraric acid</i> )		10-formil-3,9-dihidroksi-4-(hidroksimetil)-1,7-dimetil-6-oksobenzo[b][1,4]benzodiazepin-2-karboksilna kiselina



<p>Fumarprotocetrarična kiselina (<i>fumarprotocetraric acid</i>)</p>		<p>4-[[<i>(E)</i>-3-karboksi-<i>prop</i>-2-enoil]oksimetil]-10-formil-3,9-dihidroksi-1,7-dimetil-6-oksobenzo[<i>b</i>][1,4]benzodiazepin-2-karboksilna kiselina</p>
<p>Rangiformna kiselina (<i>rangiformic acid</i>)</p>		<p>(2<i>S</i>)-2-[(2<i>S</i>)-1-metoksi-1-oksoheksadekan-2-il]sukcinska kiselina</p>
<p>Norringiformna kiselina (<i>norringiformic acid</i>)</p>		<p>(2<i>R</i>,3<i>S</i>)-heptadekan-1,2,3-trikarboksilna kiselina</p>

### 1.3. Instrumentalne metode analize: HPLC, GC-MS, ICP-OES

#### 1.3.1. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC)

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom ili tečna hromatografija visokih performansi (High Pressure Liquid Chromatography/High-performance Liquid Chromatography – HPLC) jedna je od najvažnijih analitičkih metoda današnjice pomoću koje je moguće razdvojiti, identifikovati i kvantifikovati sastojke složenih organskih uzoraka. Tečna hromatografija je svaka hromatografska tehnika kod koje je pokretna faza tečnost, ali se eluiranje kod obične tečne hromatografije vrši pod dejtvom sile gravitacije zbog čega analiza traje dugo a razdvajanje je u takvoj koloni slabo. Primenom tečne hromatografije pod visokim pritiskom povećana je razlika pritisaka na krajevima kolone posebnim pumpama, zbog čega je vreme analize znatno smanjeno a postignuta je efikasnost razdvajanja i dobra rezolucija. Primenom kontrolisanog načina rada mogu se analizirati uzorci sa širokim opsegom koncentracija i molekulskih težina.

Tokom HPLC analize, rastvor uzorka injektuje se u hromatografsku kolonu poroznog materijala (stacionarna faza) a tečnost (mobilna faza) se propušta tj. eluira kroz kolonu pod visokim pritiskom. Mobilna faza služi za prenošenje injektovanog uzorka kroz separacionu

kolonu do detektora. Razdvajanje komponenata iz uzorka zasniva se na razlikama u stopama migracije kroz kolonu koje proizlaze iz selektivne raspodele komponenata između stacionarne i mobilne faze na osnovu fizičko-hemijskih interakcija. Odvojene komponente se detektuju na osnovu količine apsorbirane UV svetlosti različitih talasnih dužina, a signal koji daje detektor srazmeran je koncentraciji komponente. Hromatogram predstavlja grafički prikaz signala sa detektora u zavisnosti od retencionog vremena. Signali koji se vide na hromatogramu nazivaju se hromatografski pikovi. Retenciono vreme neke komponente zavisi od njenih hemijskih i fizičkih osobina u datim uslovima i predstavlja karakteristiku date komponente pomoću koje se vrši njena identifikacija.

Kriterijumi za odabir mobilne faze su potpuna rastvorljivost uzorka, mala viskoznost i mala isparljivost. Odabrani rastvarači treba da budu inertni prema komponentama uzorka i materijalu od koga je sastavljena hromatografska kolona. Za mobilnu fazu obično se koriste čisti rastvarači ili najčešće smeša rastvarača koji se međusobno dobro mešaju. Upotreba kombinacije rastvarača sa puferom omogućava kontrolisanje pH vrednosti mobilne faze, što može biti korisno u analizi složenih smeša sa blisko raspoređenim ili preklopljenim pikovima. Najčešće korišćeni pufer je fosfatni pufer. Rastvarači za HPLC analizu sa preko 99,9 % čistoće su komercijalno dostupni.

Tokom HPLC analize eluiranje može biti izokratsko ili gradijentno. Pri izokratskom eluiranju sastav mobilne faze ostaje isti tokom cele hromatografske analize, dok se kod gradijentnog eluiranja sastav mobilne faze menja linearno sa vremenom. Prednost gradijentnog eluiranja se ogleda u cilju smanjenja vremena analize i dobijanja boljeg razdvajanja hromatografskih pikova.

Hromatografske kolone za HPLC analizu gusto su punjene česticama stacionarne faze malih dimenzija (dijametar od 3-5  $\mu\text{m}$ ) ali velike specifične površine koje poboljšavaju razdvajanje komponenata smeše. Kolone su napravljene od čelika (kako bi izdržale visok pritisak) dužine od 20 cm i unutrašnjeg prečnika od 2 do 4 mm, dok su kolone za preparativnu tečnu hromatografiju većeg unutrašnjeg prečnika (preko 5 mm) zbog čega imaju manju efikasnost razdvajanja a veći kapacitet. Matrica kolone kao potpora stacionarne faze napravljena je najčešće od silika gela, a može biti i od polietilena ili polimetakrilata. Silika gel je površinski modifikovan tako da sadrži dugačke lance alkil grupe ili fenil grupe, u slučaju razdvajanja aromatičnih jedinjenja u uzorku. Zbog gustog punjenja otpor proticanja mobilne faze kroz kolonu je veliki pa je zato neophodno obezbediti veliku razliku u pritiscima na krajevima kolone pomoću pumpe koja ima mogućnost da razvije pritisak od 50 do 1000

atmosfera. Kolone se takođe često termostatiraju kako bi se izbegle varijacije na hromatogramu kao posledica malih temperaturnih razlika.

Najčešće korišćen način HPLC razdvajanja je hromatografija sa reverznom fazom kod koje je stacionarna faza nepolarna, a za mobilnu fazu koriste se polarni rastvarači. U ovom slučaju, postojaće snažna privlačnost između polarnog rastvarača i polarnih molekula u smeši koja prolazi kroz kolonu, zbog čega će provesti većinu svog vremena u kretanju sa rastvaračem. Nepolarna jedinjenja u smeši će težiti stvaranju privlačnosti sa alkil ili fenil grupama stacionarne faze, što će ih usporiti na putu kroz kolonu. To znači da će polarni molekuli brže eluirati kroz kolonu, a redosled eluiranja komponenata smanjivaće se polaritetom.

UV-Vis detektori se koriste za detekciju jedinjenja koja apsorbuju u ultra-ljubičastoj i vidljivoj oblasti. Mnoga organska jedinjenja, uključujući aromatična jedinjenja i jedinjenja sa hromoforima u vidu dvostrukih veza između C, N, O i S atoma, apsorbuju UV svetlost različitih talasnih dužina. Ako se snop UV svetlosti propusti kroz struju tečnosti koja izlazi iz kolone, UV detektor će na suprotnoj strani direktno očitati koliki deo svetlosti se apsorbovao. Količina apsorbovane UV svetlosti zavisice od količine određenog jedinjenja koje u tom trenutku prolazi kroz snop. Rezultat će biti zabeležen kao niz hromatografskih pikova i svaki od njih predstavlja komponentu u uzorku koja prolazi kroz detektor i apsorbuje UV svetlost. Površina pika proporcionalna je količini određene komponente i služi za kvantitativnu karakterizaciju. Kvalitativna analiza zasniva se na činjenici da apsorpcioni spektar supstance zavisi od njenog sastava i strukture, a identifikacija se može vršiti komparacijom sa apsorpcionim spektrom standarda. Na primer, maksimum apsorpcije za usninsku kiselinu je 220, 290 i 325 nm, za atranorin 210, 256 i 312 nm, za girofornu kiselinu 214, 271 i 305 nm (Huneck i Yoshimura, 1996).

HPLC sistemi opremljeni su računarom i softverom koji kontroliše operative parametre poput sastava mobilne faze, temperature, brzine protoka, zapremine i sekvence ubrizgavanja, kao i prikupljanje i obradu hromatograma.

Tečna hromatografija uopšte, a posebno HPLC, dali su izuzetan doprinos u oblastima istraživanja i razvoja proizvodnje. HPLC pronalazi brojne primene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, biohemijskim i biotehnoškim istraživanjima, u proizvodnji sintetičkih polimera, forenzici, i monitoringu životne sredine.

### 1.3.2. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS)

Gasna hromatografija je tehnika koja se primenjuje za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenata smeše organskih isparljivih jedinjenja. Odvajanje komponenata smeša zasniva se na razlikama u isparljivosti jedinjenja i njihovoj selektivnoj raspodeli između stacionarne i mobilne faze unutar hromatografske kolone praćeno sekvencijalnim eluiranjem odvojenih komponenata.

Tehnika gasne hromatografije se najčešće koristi za razdvajanje jedinjenja koja imaju veliku isparljivost (sa tačkom ključanja do čak 400 °C), termičku stabilnost i nisku molekulska masu. Mogu se analizirati i termički nestabilna ili teže isparljiva jedinjenja ukoliko se postupkom derivatizacije prevedu u stabilnija i isparljivija jedinjenja. Derivatizacija se sastoji u modifikaciji funkcionalnih grupa molekula, bez ikakvih drugih promena u molekularnoj strukturi.

Postoje dva tipa gasne hromatografije: gasno-čvrsta i gasno-tečna hromatografija. Obe metode koriste gas kao mobilnu fazu, dok je stacionarna faza različita, kao i princip po kome se vrši razdvajanje komponenti. Ako je hromatografska kolona punjena čvrstom stacionarnom fazom u vidu usitnjenog čvrstog materijala velike specifične površine i velike adsorpcione moći, kao što su silika gel, aktivni ugalj ili aluminijum dioksid, na kojima se komponente uzorka selektivno adsorbuju, reč je o gasno-čvrstoj hromatografiji. Kod gasno-tečne hromatografije (ili gasne hromatografije) stacionarna faza je tečna i u vidu kapilarnog sloja raspoređena je na inertnom i čvrstom nosaču (kod pakovanih kolona) ili po unutrašnjem zidu kolone (kod kapilarnih kolona), dok se komponente uzorka odvajaju na osnovu rastvarljivosti u tečnoj stacionarnoj fazi (mehanizam podeone hromatografije). Stacionarna tečna faza koja se primenjuje uglavnom ima malu isparljivost i visoku temperaturu raspadanja.

Prednost kapilarnih u odnosu na pakovane kolone ogleda se u većoj efikasnosti razdvajanja, boljoj rezoluciji, kraćem vremenu rada i primeni manje količine uzorka. Ovaj tip kolone ima dužinu od par desetina metara do preko 100 m, sa unutrašnjim prečnikom manjim od 1 mm, i postavljen je u hromatografu u vidu kotura. Pakovane kolone izrađene su uglavnom od nerđajućeg čelika ili stakla. Nosač tečne stacionarne faze je inertan i ravnomerno usitnjen čvrst materijal (na primer, diatomajska zemlja) na koji je odgovarajućim tehnološkim postupkom naneta tečnost. Dužina pakovanih kolona je znatno kraća u poređenju sa kapilarnim (2-4 m), ali prečnik može da dostigne i do nekoliko milimetara. Kolone su veće dužine u gasnoj nego u tečnoj hromatografiji zbog niže viskoznosti gasa i veće brzine protoka mobilne faze.

U svrhu boljeg razdvajanja složenih uzorka koji sadrže stotine, pa čak i hiljade komponenata različite isparljivosti, a samim tim i dobijanja željene rezolucije razdvojenih hromatografskih pikova, može se koristiti multidimenzionalna hromatografija, koja zahteva primenu različitih kolona koje se vezuju jedna na drugu.

Mobilna faza kao noseći gas može biti helijum, azot, vodonik ili argon i ima ulogu prenosioca uzorka kroz kolonu do detektora. Čistoća nosećeg gasa treba biti 99,995 %. Noseći gas se iz boce preko regulatora pritiska i protoka uvodi u kolonu. Iz specijalnih špriceva (mikrošpriceva) sa mogućnošću odmeravanja vrlo malih zapremina (oko 1  $\mu$ l), tečni uzorak se ubacuje u zagrejani injektor pri čemu dolazi do trenutnog isparavanja. Ako su uzorci u gasovitom stanju, injektuju se posebnim gasnim slavinama u određenoj zapremini (oko 1 ml). Noseći gas u ovom slučaju obezbeđuje inertnu sredinu za pretvaranje injektovanog tečnog uzorka u paru i prenos kroz kolonu bez ikakvih promena u njegovim karakteristikama. Kako je kolona (koja se nalazi u posebnom termostatu) direktno povezana sa isparivačem, pare uzorka nošene mobilnom fazom odmah dospevaju u nju. U koloni dolazi do razdvajanja komponenata na osnovu koeficijenta raspodele ili različitog adsorpcionog afiniteta prema stacionarnoj i mobilnoj fazi, tako da pare komponenata uzorka putuju različitom brzinom. Gas nosač ispire sa kolone razdvojene komponente i one prolaze kroz detektor, u kome se detektuju kao električni signali, čiji su intenziteti proporcionalni njihovim koncentracijama u gasu nosača. Signal iz detektora se preko pojačivača šalje pisaču i beleži se u funkciji vremena. Dobijeni hromatogram predstavlja krivu zavisnosti jačine signala od vremena zadržavanja (retencionog vremena). Pomoću operativnog softvera moguće je kontrolisati uslove rada (sekvenca i zapremina injektovanja uzoraka i standarda, brzina protoka nosača, broj ciklusa pranja, programiranje temperature, pritisak u koloni, rad detektora, itd) u cilju boljeg razdvajanja komponenata uzorka, poboljšanja efikasnosti analize i bolje rezolucije hromatograma.

Temperatura kolone je veoma bitan parametar u gasnoj hromatografiji. Što je temperatura viša, komponente brže prolaze kroz kolonu ali će interakcija sa stacionarnom fazom kao i njihovo međusobno radvajanje biti slabije. Suprotno, pri nižim temperaturama analiza je sporija ali u korist boljoj rezoluciji. Ukoliko se temperatura u koloni održava na konstantnoj vrednosti u toku hromatografske analize dobijamo izotermnu metodu analize. Pogodna je za analiziranje komponenata uzorka sa niskim stepenom isparljivosti. Kod češće korišćene temperaturno programske metode, postoji kontinuiran porast temeperature unapred određenom brzinom tokom analize uzorka. Prednost ove metode analize je dobijanje dobre

rezolucije, međutim, povećanje temperature kolone često dovodi do isparavanja tečne stacionarne faze što se može videti na hromatogramu kao podizanje bazne linije.

Uloga detektora je da reaguje na prisustvo određene komponente tako što proizvodi signal koji je srazmeran njenoj koncentraciji. U zavisnosti od toga da li komponenta biva hemijski izmenjena prilikom detektovanja, razlikujemo nedestruktivne i destruktivne detektore. Postoji i specifični i nespecifični detektori koji detektuju određenu klasu jedinjenja ili sva jedinjenja. Najmanja koncentracija komponente koju detektor može da registruje predstavlja granicu detekcije. U analitičkoj hromatografiji poželjno je da detektori imaju što nižu granicu detekcije i nije važno da li su destruktivni, dok sa druge strane, u preparativnoj hromatografiji detektori ne smeju biti destruktivni dok granica detekcije nije važan parametar.

Najčešće su korišćeni detektori toplotne provodljivosti (TCD, thermal conductivity detector) i plameno-jonizujuć detektori (FID, flame ionization detector). Detektor toplotne provodljivosti meri razliku u toplotnoj provodljivosti čistog gasa nosača i gasa nosača koji sadrži komponente uzorka tj. meri se promena toplotne provodljivosti gasa nosača kad se u njemu pojavi komponenta. Nastala struja srazmerna je koncentraciji komponente. Kod plameno-jonizujućeg detektora gas iz kolone kontinuirano se uvodi u plamen, koji je smešten između dve suprotno naelektrisane elektrode, pri čemu se komponente nošene gasom jonizuju na visokoj temperaturi plamena, dajući jone, koji se sakupljaju na odgovarajućoj elektrodi. Nastala jonizujuća struja odgovara koncentraciji komponente. Osim pomenutih postoje i drugi tipovi detektora: elektronsko apsorpcioni (ECD, electron capture detector), plameno-fotometrijski (FPD, flame photometric detector), termalno-jonizujuć (TID, thermionic ionization detector), foto-jonizujuć (PID, photo-ionization detector), na bazi infracrvene Furijeove transformacije (FTIR, Fourier-transform infrared spectrometer), i drugi.

Gasna hromatografija nudi visoku osetljivost analize za uzorke koji mogu biti tečnost, gas ili rastvorena čvrsta supstanca. Ima značajnu primenu u laboratorijama za ispitivanje i kontrolu kvaliteta u petrohemiji, industriji hrane i farmaceutskim proizvodima, etarskih ulja u kozmetičkoj industriji. Ova tehnika pronašla je ograničenu primenu u hemiji lišajeva, jer je većina supstanci lišaja vrlo polarna i ima malu isparljivost (Huneck i Yoshimura, 1996). S toga, je u kombinaciji sa masenom spektrometrijom našla bolju primenu u identifikaciji i strukturnom određivanju lišajevskih supstanci.

Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) koja je nezamenljiva u analizi tragova u medicini, kriminalistici i zagađenju životne sredine, koristi maseni spektrometar kao detektor. To je uređaj koji radvaja jone sa različitim odnosima mase i

naelektrisanja ( $m/z$ ). Nakon izlaska iz kolone gde pritisak gasa iznosi preko 1 bar, gas sa razvojenim komponentama se prevodi na niži pritisak jer je u masenom spektrometru pritisak od oko 10 mbar. Komponente se jonizuju u jonizatoru a zatim ubrzavaju do analizatora mase, gde se razdvajaju u prostoru ili vremenu (u tehnici vremena preleta) pod dejstvom magnetnog ili električnog polja. Kao detektor koristi se najčešće elektronski multiplikator. Maseni spektar predstavlja prikaz intenziteta dobijene struje jonskih vrsta u funkciji od njihovog odnosa mase i naelektrisanja. Prikupljanje podataka se može vršiti u režimu potpunog skeniranja (pokriva širok opseg odnosa  $m/z$ ) ili režimu skeniranja odabranih jona pri čemu se prikupljaju podaci samo za odabrane jone posmatranog molekula.

Postoji više načina jonizacije u zavisnosti od jonskog izvora: elektronska jonizacija (EI, electron ionisation), elektrosprej jonizacija (ESI, electrosprey ionisation), hemijska jonizacija (CI, chemical ionisation), hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (APCI, atmospheric-pressure chemical ionization), jonizacija brzim atomima (FAB, fast atom bombardment), matriksom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija (MALDI, matrix assisted laser desorption/ ionisation). Razlikujemo i više tipova analizatora: kvadrupolni, magnetni, jonski trap (ion trap) i analizator sa vremenom preletanja (TOF, time of flight).

Gasni hromatogram nastaje kao prikaz ukupne jonske struje (TIC, total ion current) u zavisnosti od retencionog vremena. Svaki hromatografski pik generisaće jedinstven spektar mase koji se koristi za identifikaciju jedinjenja, tako što se vrši poređenje snimljenog masenog spektra sa spektrima poznatih jedinjenja iz elektronske baze podataka. Površina hromatografskog pika proporcionalna je koncentraciji odgovarajućeg jedinjenja, kao i kod HPLC tehnike. Prilikom jonizacije može doći i do fragmentacije molekula tj. do njegovog raspadanja na više jona, i tada maseni spektar predstavlja njemu svojstven otisak prsta. U ovom slučaju, vrši se identifikacija komponenti prema njegovoj specifičnoj fragmentaciji.

Gasna hromatografija kuplovana sa masenom spektrometrijom korisna je metoda za analizu lišajevskih metabolita kao što su ksantoni, antrahinoni, dibenzofurani, terpeni i pulvinska kiselina kojima nedostaje termolabilna estarska grupa (Karunaratne i saradnici, 2005).

### **1.3.3. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)**

Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) je tehnika za detekciju tragova elemenata u različitim multielementnim uzorcima. Zasniva se na

merenju intenziteta emitovanog zračenja koju emituju pobuđeni atomi nastali u induktivno spregnutoj plazmi argona. Prednost ove tehnike je relativno niska granica detekcije, mala količina uzorka, visok kapacitet za simultano i precizno detektovanje većeg broja elemenata u uzorku, kratki vremenski intervali analize i širok raspon koncentracija uzorka. Argon je hemijski inertni gas koji ne reaguje sa jonima iz uzorka, ima visoku energiju jonizacije što povećava verovatnoću pobuđivanja za većinu elemenata periodnog sistema.

Tečni uzorak za analizu pomoću peristaltičke pumpe prolazi kroz raspršivač pretvarajući uzorak u aerosol koji se uvodi u plazma plamenik. Na kraju kvarcnog plamenika nalazi se indukcionni kalem koga napaja radiofrekventni generator. Kao posledica nastale visokofrekventne struje kroz indukcionni kalem, indukuje se oscilatorno magnetno polje, a ubrzani elektroni u sudaru sa atomima argona dovode do zagrevanja i jonizacije stvarajući stabilnu plazmu argona. Plazma je četvrto agregatno stanje materije tj. stanje visoko jonizovanog gasa. Temperatura plazme je izuzetno visoka i može dostići do nekoliko hiljada Celzijusovih stepeni. Atomi iz uzorka u sudaru sa jonima i elektronima plazme primaju energiju i dostižu više pobuđeno stanje. Vraćanjem u osnovno stanje emituje se elektromagnetno zračenje tačno određene talasne dužine dajući karakteristični spektar emisije koji se meri spektrometrom. Kvalitativna analiza zasniva se na činjenici da je talasna dužina emitovane svetlosti određena strukturom elektronskog omotača atoma koji je karakterističan za svaki atom. Intenzitet emitovanog zračenja je proporcionalan broju pobuđenih atoma tj. koncentraciji elementa. Kvantitativna analiza se vrši pomoću metode kalibracione krive gde se nepoznata koncentracija elementa izračunava poređenjem intenziteta emisije ispitivanog uzorka sa standardima na određenoj talasnoj dužini. Ova metoda je našla široku primenu u svim granama toksikologije: medicinskoj, forenzičkoj, toksikologiji životne sredine i prehrambenih namirnica.

Postoje mnoga istraživanja o lišajevima kao dobrim pokazateljima kvaliteta vazduha, jer sadržaj metala u lišajevima varira paralelno sa sadržajem metala u njegovoj okolini. Koncentracija metala merena je u lišajevima *Evernia prunstri* i *Parmelia sulcata* (Stamenković i saradnici, 2013) i *Flavoparmelia caperata* (Mitrović i saradnici, 2012), koji rastu u jugositočnom delu Srbije. Aslan i saradnici (2004) determinisali su sadržaj određenih elemenata u lišaju *R. capitata*.



#### **1.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita**

Mnogi procesi povezani sa proizvodnjom slobodnih radikala pokreću u ljudskom organizmu različite fiziološke i fiziopatološke procese kao što su kardiovaskularna oboljenja, kanceri, dijabetes, inflamatorna oboljenja, neurodegenerativne bolesti, Alchajmerova bolest, starenje. Slobodni radikali su molekuli koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, što dovodi do njihove izražene reaktivnosti. Među slobodne radikale ubrajamo reaktivne vrste kiseonika – hidroksi radikali, vodonik peroksid, superoksid anjon, i reaktivne vrste azota – azot oksid i peroksinitril. Oksidativni stres u biološkim sistemima je složen proces koji se odlikuje narušavanjem ravnoteže između proizvodnje slobodnih radikala i sposobnosti organizma da eliminiše ove reaktivne vrste tj. da održi antioksidativni odbramben mehanizam (Santos-Sánchez i saradnici, 2019). Ljudski organizam se protiv slobodnih radikala, osim sopstvenim odbrambenim mehanizmom, brani i antioksidansima unetim putem ishrane. Antioksidansi prirodnog porekla privukli su posebno interesovanje zbog svoje efikasnosti u sprečavanju destruktivnih procesa izazvanim oksidativnim stresom. Imaju sposobnost da stabilizuju ili deaktiviraju slobodne radikale, često pre nego što napadnu biološku ćeliju. Lišajevi mogu biti dobar izvor prirodnih antioksidanasa jer su bogati sekundarnim metabolitima u vidu fenolnih jedinjenja, dobro poznata po svojim antoksidativnim svojstvima. Fenolna jedinjenja inhibiraju slobodne radikale prenošenjem atoma vodonika iz njegove hidroksilne grupe, formirajući manje reaktivan fenoksil radikal (Sawa i saradnici, 1999).

Na osnovu literaturnih podataka postoje brojna istraživanja koja opisuju antioksidativna svojstva ekstrakata lišajeva, a sve je više i studija koja proučavaju antioksidativnu prirodu izolovanih metabolita. Halici i saradnici (2011) ispitivali su antioksidativne aktivnosti ekstrakata lišaja *R. capitata* tiocijanatnom metodom, a ispitivani ekstrakti pokazali su statistički značajnu antioksidativnu aktivnost u testu inhibicije peroksidacije linolne kiseline. Nardemir i saradnici (2015) ispitivali su antioksidativnu aktivnost metanolnog ekstrakta lišaja *P. horizontalis*, određivanjem nivoa aktivnosti antioksidativnih enzima u krvi čoveka, uključujući superoksid dismutazu, glutation, glutation peroksidazu i malondialdehid. Ovom analizom utvrđeno je da ispitivani lišaj poseduje značajni antioksidativni efekat. Kotan i saradnici (2013) dokazali su značajni zaštitni efekat metanolnog ekstrakta lišaja *C. rangiformis* protiv oksidativnog stresa prouzrokovanog od strane kancerogene supstance aflatoksina B1. Yücel i saradnici (2007) su takođe analizirali antioksidativnu aktivnost ekstrakata lišaja *C. rangiformis*, dokazavši da hloroformski ekstrakt pokazuje značajnu antioksidativnu aktivnost i ima najveći

sadržaj fenolnih jedinjenja, dok metanolni ekstrakt pokazuje najveću redukcionu moć. Analizom pomoću DPPH metode, praškasti materijal lišaja *C. rangiformis* pokazao je značajni antioksidativni kapacitet (Mendili i saradnici, 2021).

### 1.5. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti

Za određivanje antioksidativne aktivnosti acetonskih ekstrakata ispitivanih lišajeva korišćene su sledeće metode: Određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC), DPPH metoda, ABTS metoda, CUPRAC metoda i metoda određivanja ukupne redukcionne moći (TRP).

Metoda zasnovana na Folin-Ciocalteu reagensu (smešu molibdanfosfatnih i volframofosfatnih anjona) koristi se za određivanje i kvantifikovanje ukupnih fenola i bazira se na promeni boje koja nastaje kao posledica reakcije fenola sa reagensom (Singleton i saradnici, 1999). Fenoli se u baznoj pH sredini oksiduju do hinona u prisustvu Folin-Ciocalteu reagensa koji se redukuje, i iz žute prelazi u plavo obojenje, čiji se intenzitet meri na 750 nm. Rezultati se najčešće izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (mg GAE) u određenoj količini uzorka.

DPPH metoda zasniva se na merenju apsorpcije rastvora uzorka određene antioksidativne aktivnosti da reaguje i "zarobi" DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (DPPH<sup>\*</sup>). Delokalizacijom elektrona DPPH<sup>\*</sup> je stabilan i daje ljubičastu boju, koju karakteriše apsorpcija u rastvoru na oko 520 nm. Kada je rastvor DPPH<sup>\*</sup> u kontaktu sa uzorkom (antioksidansom) koji može donirati atom vodonika, nastaje redukovani oblik DPPH-H sa gubitkom boje i samim tim smanjenjem ili gubitkom apsorpcije. Antioksidativna aktivnost je izražena u mikromolima Troloksa (kao standarda) na 100 grama uzorka (Lee i saradnici, 1998).

ABTS metoda zasniva se na dobijanju radikalnog katjona ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfat)) reakcijom oksidacije sa kalijum-persulfatom (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), stvarajući rastvor plavo-zelenkaste boje koja apsorbuje na talasnoj dužini od 734 nm. Redukcija ABTS<sup>•+</sup> antioksidansom iz uzorka dovodi do smanjenja koncentracije katjonskog radikala i promene boje rastvora. Stepem promene boje može se izraziti kao procenat inhibicije ABTS<sup>•+</sup>. Vrednosti IC<sub>50</sub> pokazuje koncentraciju uzorka potrebnu za uklanjanje 50 % ABTS<sup>•+</sup> (Re i saradnici, 1999).

CUPRAC metoda (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) temelji se na merenju apsorpcije CUPRAC hromofore, helatnog kompleksa Cu(I)-neokuproin narandžasto-crvene boje, koji se formira kao produkt redoks reakcije antioksidansa sa svetlo-plavim CUPRAC reagensom (helatni kompleks Cu(II)-neokuproin), gde se apsorbanca beleži na talasnoj dužini od 450 nm. CUPRAC test se radi na pH koja je približna fiziološkoj pH vrednosti, a prednosti u

odnosu na ostale metode su povoljniji redoks potencijal, stabilnost reagensa na prisustvo kiseonika iz vazduha, vlažnost i sunčevu svetlost, i primenljivost na lipofilne i hidrofilne antioksidanse. Rezultati se izražavaju u mg Troloksa po litru uzorka (Apak i saradnici, 2009).

Metoda ispitivanja ukupne redukcionne moći (TRP-Total Reducing Power) zasniva se na sposobnosti uzorka da redukuje  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  jone do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  jone koji reaguju sa viškom  $\text{Fe}^{3+}$  jona, dajući "Berlinsko plavo" -  $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Merenjem apsorbance na 700 nm određuje se količina dobijenog plavog kompleksa, a samim tim i moć redukcije određenog uzorka (Oyaizu, 1986).

### **1.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ispitivanih lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita**

Acetonski, metanolni i hloroformski ekstrakti lišaja *R. capitata* poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost (Cansaran i saradnici, 2007; Houshyar i saradnici, 2014). Metanolni, hloroformski, acetonski i vodeni ekstrakti lišaja *C. rangiformis* pokazali su umerenu antibakterijsku aktivnost (Yücel i saradnici, 2007; Brakni i saradnici, 2018; Brakni i Ali Ahmed, 2018), dok su Açıkgöz i saradnici (2013) dokazali da metanolni ekstrakt poseduje i umereni antifungalni efekat na *Candida albicans*. Antibakterijski i antifungalni efekat etarskog ulja lišaja *C. rangiformis* je takođe dokazan od strane Kahriman i saradnika (2012).

U ovom istraživanju ispitivano je delovanje acetonskih ekstrakata lišajeva na dve Gram-pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) i tri Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Pseudomonas aeruginosa*).

*Escherichia coli* spada u grupu Gram-negativnih bakterija sa fakultativnom anaerobnom respiracijom. Ima oblik štapića dužine 1-2  $\mu\text{m}$ . Većina sojeva ima sposobnost kretanja pomoću peritrihijalnih flagela ili cilija. Na hranljivom agaru kolonije *E. coli* su okruglog oblika, sivkasto-bele boje, glatke teksture. Često izgledaju poput sluzi ili mutnog filma po celoj površini hranljive podloge. Prirodno stanište većine bezopasnih bakterija ovog soja je crevni sistem čoveka i životinja, međutim neki sojevi *E. coli* su patogeni i mogu kontaminirati hranu i izazvati intoksikaciju.

*Staphylococcus aureus*, kao i sve bakterija iz grupe stafilokoka, ima loptast oblik i formira grozdove. Po Gramu se boji pozitivno. *S. aureus* spada u fakultativno anaerobne bakterije. Poseduju kapsulu i nemaju mogućnost kretanja. Kolonije su okrugle i konveksne sa prečnikom od 1-4 mm. Zlatno-žuta boja kolonija potiče od karotenoidnog pigmenta

stafiloksantina (aureus na latinskom znači „zlatno“). Većina sojeva je patogena i izaziva mnoštvo različitih infekcija i intoksikacija. Neki sojevi su rezistentni na antibiotike.

*Salmonella abony* je Gram-negativna bakterija u obliku štapića, dužine od 2-5  $\mu\text{m}$ . Pretežno su pokretne enterobakterije sa peritrihijalnim flagelama koje se nalaze po čitavoj površini ćelije. *S. abony* takođe spada u bakterije sa fakultativnom anaerobnom respiracijom. *Salmonela* je poznata po svojoj sposobnosti da godinama preživi u uslovima bez vlage, otporna je na niskim temperaturama, ali UV svetlost i toplota ubrzavaju uništavanje. Ovaj soj bakterije je patogen i može izazvati gastrointestinalne bolesti.

*Pseudomonas aeruginosa* je prioritetno aerobna, mada može biti i fakultativno anaerobna bakterija, i po obliku spada u štapićaste bakterije dužine od 1-5  $\mu\text{m}$ , koje se kreću pomoću monotrihijalne flagele. Na površini bakterije su prisutne i fimbrije. Po Gramu se boji negativno. Ovaj soj bakterije proizvodi pigmente piocijanin (plave boje) i pioverdina (zelene boje), koji daju karakterističnu plavo-zelenu boju ovoj kulturi. *P. aeruginosa* je sveprisutna bakterija i predstavlja patogen soj bakterija koji ima ogroman potencijal da razvije rezistentnost na antibiotike.

*Bacillus subtilis* je Gram-pozitivna bakterija, štapićastog oblika dužine 4-10  $\mu\text{m}$ , koja poseduje veliki broj flagela. Mnogi sojevi proizvode spore koje im omogućavaju da tolerišu ekstremne uslove okoline. Smatraju se strogo aerobnim, mada mogu opstati i u anaerobnim uslovima. Prirodno stanište ovog soja bakterija je zemljište i vegetacija. *B. subtilis* nema patogenu osobinu, ali može u nekim slučajevima izazvati intoksikaciju. Koriste se kao biofungicidi. Dokazano je da *B. subtilis* proizvodi antibiotike (Jamil i saradnici, 2007).

### **1.7. Genotoksična aktivnost ekstrakata ispitivanih lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita**

Genotoksikologija (genetička toksikologija) predstavlja naučnu oblast koja se bavi proučavanjem štetnog uticaja raznih agenasa na proces prenošenja genetskog materijala. Glavni cilj je otkrivanje novih agenasa tj. genotoksina koji poseduju potencijal za prouzrokovanje oštećenja DNK ili hromozoma u germinativnim (polnim) ili somatskim (telesnim) ćelijama organizma, razumevanje njegovog mehanizma delovanja i procenivanje stepena rizika izlaganja tim agensima. Oštećenja DNK u polnoj ćeliji mogu negativno uticati na reprodukciju i izazvati promenu naslednih osobina (mutaciju gena), dok oštećenje DNK u somatskoj ćeliji može rezultirati somatskom mutacijom, što može dovesti do maligne transformacije (karcinoma). Mutacije su trajno nasledno prenosive promene u genetskom materijalu.

Genetska oštećenja se mogu javiti u vidu promene na DNK lancu (genetska mutacija) koje izazivaju mutageni, strukturne promene hromatinskog materijala (hromozomska aberacija) koje izazivaju klastogeni, i promene u broju hromozoma (aneuploidija i poliploidija) koje izazivaju aneugeni. Shodno tipovima genetskog oštećenja, postoje mnogi *in vitro* i *in vivo* testovi koji se zasnivaju na detekciji genetskih mutacija, hromozomskih promena i oštećenja na nivou DNK.

Mikronukleusni test omogućava određivanje genotoksičnog efekta i hromozomske nestabilnosti, koje uključuju prekide, gubitke delova i rekombinaciju ili nerazdvajanje hromozoma. Cilj ovog testa je detekcije prisustva mikronukleusa i određivanje njihovih učestalosti u različitim tipovima ćelija koje su izložene hemijskim, fizičkim i biološkim mutagenima, kao i stresnim uslovima. Mikronukleusi se formiraju iz fragmenata hromozoma ili čitavih hromozoma zaostalih kao posledica nepravilno popravljenih prekida DNK lanaca, koji se tokom metafaze ili anafaze nisu integrisali u jedro jedne od ćerki ćelija dobijene deobom ćelija. Prekid i fragmentacija hromozoma nastaje pod dejstvom klastogenih agenasa. Prisustvo mikronukleusa obično je pokazatelj genotoksičnosti i hromozomske nestabilnosti, dok je broj nastalih mikronukleusa direktno proporcionalan stepenu hromozomske aberacije (Wagner i saradnici, 2011). Mikronukleusi su često prisutni u ćelijama karcinoma. Standardni *in vitro* mikronukleusni test obično se izvodi na limfocitima perifernih ćelija, a najčešće se koristi metoda blokade citokineze (CBMN, cytokinesis-blocked micronucleus assay), koja uključuje citohalazin B za sprečavanje citokineze (proces deobe citoplazme).

Postoji veliki broj naučnih publikacija koje pokazuju značajne inhibitorne aktivnosti ekstrakata lišajeva i njihovih izolovanih sekundarnih metabolita protiv raznih ćelijskih kancera. Prethodna istraživanja pokazala su da ekstrakti lišaja *C. rangiformis* poseduje jaku antitumorsku aktivnost (Bézivin i saradnici, 2003; Kotan i saradnici, 2013). Nardemir i saradnici (2015) dokazali su snažan antimutagen efekat metanolnog ekstrakta *P. horizontalis*.

### **1.8. Uticaj ekstrakata ispitivanih lišajeva na aktivnost holinesteraze**

Holinesteraza je enzim koji katalizuje hidrolizu neurotransmitera acetilholina dobijanjem acetata i holina, i uglavnom se nalazi u neuromišićnim spojnicama i sinapsama mozga. Enzim pripada grupi serumskih proteaza i uključuje dve vrste: acetilholinesterazu (nalazi se u nervnim i mišićnim tkivima i u membranama crvenih krvnih zrnaca) i pseudoholinesterazu, poznatu kao holinesterazu u plazmi ili butirilholinesterazu (nalazi se prvenstveno u jetri). Enzim ima izuzetno visoku specifičnu katalitičku aktivnost.

Tokom neurotransmisije, acetilholin se oslobađa iz neurona i vezuje se za svoje receptore prenoseći impuls. Acetilholinesteraza zaustavlja prenos impulsa brзом hidrolizom acetilholina. Tako oslobođen holin se ponovo preuzima od strane nerva i koristi za ponovnu sintezu acetilholina. Različiti fiziološki procesi utiču na sintezu acetilholina i time smanjuju holinergični prenos u različitim delovima mozga, što za posledicu ima pojavu neurogenerativnih bolesti poput Alchajmerove bolesti, Parkinsonove bolesti i demencije Levijevih tela. Upotrebom inhibitora holinesteraze (antiholinesteraze) blokira se normalna razgradnja acetilholina, čime se povećava njegov nivo koncentracije, aktiviraju se receptori i produžava se delovanje acetilholina kao neurotransmitera u centralnom i perifernom nervnom sistemu, što sprečava napredovanje bolesti.

Inhibitori holinesteraze klasifikuju se kao reverzibilni, ireverzibilni ili pseudo-reverzibilni. Reverzibilni inhibitori holinesteraze se obično koriste u terapeutske svrhe, dok su toksični efekti povezani sa ireverzibilnim i pseudoreverzibilnim inhibitorima i često se koriste kao insekticidi i biološki agensi.

Lišajevi se potencijalno mogu koristiti u terapeutske svrhe kao inhibitori aktivnosti određenih enzima koji su odgovorni za pojavu nekih bolesti ili poremećaja (Kekuda i saradnici, 2019). U prethodnim istraživanjima, Luo i saradnici (2013) otkrili su da ekstrakt lišaja *C. macilenta* pokazuje visoku aktivnost inhibicije holinesteraze. Vrste lišajeva roda *Ramalina* kao i izolovana usninska kiselina pokazali su efikasnu inhibiciju  $\alpha$  i  $\beta$ -glukozidaze (Verma i saradnici, 2012). Dokazano je da su tenuiorin i metil-orselinat, izolovani iz lišaja *P. leucophlebia*, inhibitori 5-/15-lipoksigenaze (Ingólfssdóttir i saradnici, 2002). Proksa i saradnici (1994) pokazali su inhibitornu aktivnost atranorina, izolovanog iz lišaja *Pseudevernia furfuracea*, protiv tripsina i elastaze.

### **1.9. Ostale biološke aktivnosti ekstrakata ispitivanih lišajeva i njihovih najzastupljenijih konstituenata**

Na osnovu pregleda literature, u Tabeli 5 prikazane su biološke aktivnosti ekstrakata lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis*, kao i biološka svojstva najrepresentativnijih sekundarnih metabolita koji ulaze u sastav pomenutih vrsta. Moglo bi se zaključiti da se ekstrakti i izolovani metaboliti kao glavni nosioci bioloških aktivnosti lišaja, mogu smatrati perspektivnim izvorom potencijalnih lekova sa antimikrobnim, antioksidativnim i citotoksičnim karakteristikama.

**Tabela 5.** Aktivnosti ekstraktata i izolovanih komponenti ispitivanih vrsta lišajeva

<b>Ekstrakti lišajeva/ komponente lišajeva</b>	<b>Biološka aktivnost</b>	<b>Referenca</b>
<i>R. capitata</i> acetonski ekstrakt	antimikrobna aktivnost	Cansaran i saradnici, 2007
<i>R. capitata</i> metanolni ekstrakt	antimikrobna aktivnost	Houshyar i saradnici, 2014
	antioksidativna aktivnost	Halici i saradnici, 2011
<i>R. capitata</i> hloroformski ekstrakt	antimikrobna aktivnost	Houshyar i saradnici, 2014
<i>R. capitata</i> etanolni ekstrakt	antioksidativna aktivnost	Halici i saradnici, 2011
<i>R. capitata</i> vodeni ekstrakt	antioksidativna aktivnost	Halici i saradnici, 2011
	antigenotoksična aktivnost	Geyikoglu i saradnici, 2007
<i>P. horizontalis</i> acetonski ekstrakt	citotoksična aktivnost	Delebassée i saradnici, 2017
<i>P. horizontalis</i> metanolni ekstrakt	antioksidativna aktivnost	Nardemir i saradnici, 2015
	antimutagena aktivnost	Nardemir i saradnici, 2015
	inhibicija enzima	Kinoshita i saradnici, 2006
<i>C. rangiformis</i> acetonski ekstrakt	antibakterijska aktivnost	Brakni i Ali Ahmed, 2018
	antioksidativna aktivnost	Mendili i saradnici, 2021
<i>C. rangiformis</i> etarski ekstrakt	citotoksična aktivnost	Bézivin i saradnici, 2003
<i>C. rangiformis</i> vodeni ekstrakt	antimikrobna aktivnost	Brakni i Ali Ahmed, 2018
<i>C. rangiformis</i> hloroformski ekstrakt	antimikrobna aktivnost	Brakni i Ali Ahmed, 2018
	antioksidativna aktivnost	Yücel i saradnici, 2007
	citotoksična aktivnost	Açıkgöz i saradnici, 2013
<i>C. rangiformis</i> metanolni ekstrakt	antimikrobna aktivnost	Brakni i Ali Ahmed, 2018
	antioksidativna aktivnost	Mendili i saradnici, 2021
	antimutagena aktivnost	Kotan i saradnici, 2013
	citotoksična aktivnost	Coşkun i saradnici, 2015
	antiinflamatorna aktivnost	Süleyman i saradnici, 2002
<i>C. rangiformis</i> cikloheksanski ekstrakt	antifugalna aktivnost	Brakni i saradnici, 2018

<i>C. rangiformis</i> dihlormetanski ekstrakt	antibakterijska aktivnost	Brakni i saradnici, 2018
etarsko ulje <i>C. rangiformis</i>	antimikrobna aktivnost	Kahriman i saradnici, 2012
usninska kiselina ( <i>usnic acid</i> )	antikancerogena aktivnost	Bačkorová i saradnici, 2011
	antibakterijska aktivnost	Manojlović i saradnici, 2012 <sup>b</sup>
	antioksidativna aktivnost	White i saradnici, 2014
	UV-protektivna aktivnost	Sanchez i saradnici, 2006
	antivirusna aktivnost	Yamamoto i saradnici, 1995
tenuiorin ( <i>tenuiorin</i> )	inhibicija enzima	Salgado i saradnici, 2018
giroforna kiselina ( <i>gyrophoric acid</i> )	antikancerogena aktivnost	Bačkorová i saradnici, 2011
	antioksidativna aktivnost	Kosanić i saradnici, 2014 <sup>b</sup>
	antimikrobna aktivnost	Kosanić i saradnici, 2014 <sup>b</sup>
atranorin ( <i>atranorin</i> )	antikancerogena aktivnost	Bačkorová i saradnici, 2011
	antioksidativna aktivnost	Kosanić i saradnici, 2014 <sup>a</sup>
	antimikrobna aktivnost	Kosanić i saradnici, 2014 <sup>a</sup>
protocetrarična kiselina ( <i>protocetraric acid</i> )	antibakterijska aktivnost	Manojlović i saradnici, 2012 <sup>b</sup>
	antikancerogena aktivnost	Manojlović i saradnici, 2012 <sup>b</sup>
	imunostimulaciona aktivnost	Santos i saradnici, 2004
fumarprotocetrarična kiselina ( <i>fumarprotocetraric acid</i> )	antimikrobna aktivnost	Kosanić i saradnici, 2014 <sup>a</sup>
	antikancerogena aktivnost	Kosanić i saradnici, 2014 <sup>a</sup>
	antioksidativna aktivnost	Dévéhat i saradnici, 2007
	imunostimulaciona aktivnost	Santos i saradnici, 2004
rangiformna kiselina ( <i>rangiformic acid</i> )	antimikrobna aktivnost	Benn i saradnici, 1998
	citotoksična aktivnost	Benn i saradnici, 1998



## 2. EKSPERIMENTALNI DEO

### 2.1. Aparati

Za izradu eksperimentalnog dela korišćeni su sledeći aparati:

- ❖ Ultrazvučno kupatilo (UZK 8, Maget, Bela Palanka, Republika Srbija) – za pripremu ekstrakata odabranih vrsta lišajeva;
- ❖ Rotacioni vakuum uparivač (KNF Laboxact, Nemačka) – za uparavanje rastvarača;
- ❖ HPLC uređaj (System 1200 series, Agilent Technologies, SAD) sa DAD detektorom – za određivanje fenolnih jedinjenja u analiziranim ekstraktima;
- ❖ GC-MS/MS uređaj (7890/7000B, Agilent Technologies, SAD) sa triplkvadrupolom (QqQ) i Combi Pal autosemplerom – za analizu isparljivih komponenti analiziranih ekstrakata;
- ❖ ICP-OES uređaj (iCAP 6000, Thermo Scientific, Velika Britanija) – za određivanje sadržaja odabranih elemenata u lišajevskom materijalu;
- ❖ UV-VIS spektrofotometar (Perkin Elmer Lambda 15, SAD) – za ispitivanje antioksidativne aktivnosti analiziranih ekstrakata;
- ❖ Termostat (Raypa, Španija) – za ispitivanje antimikrobne aktivnosti;
- ❖ Konelab 20 analizator (Thermofisher Scientific, Finska) – za ispitivanje inhibicije humane holinesteraze;
- ❖ MicroMed sistem (Thermo Electron LED GmbH, Nemačka) – za dobijanje vode visokog stepena čistoće (provodljivost 0,05  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

### 2.2. Reagensi i rastvori

U eksperimentalnom radu korišćeni su navedeni reagensi i rastvori:

- ❖ Aceton, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka);
- ❖ Dietil-etar, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka);
- ❖ Etil-acetat, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka);
- ❖ Dihlormetan, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka);
- ❖ Metanol, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka);
- ❖ Dejonizovana voda, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka);
- ❖ Mravlja kiselina, p.a. čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka);

- ❖ HNO<sub>3</sub>, 95 % rastvor (Merck, Nemačka);
- ❖ Standardi korišćeni za kalibracione prave kod ICP-OES metode:
  - Multielementni standardni rastvor IV (Al, As, Ba, Be, B, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Se, Tl, V, Zn) (TraceCERT, Fluka Analytical, Švajcarska);
  - Multielementni standardni rastvor III (Ca, K, Mg, Na) (TraceCERT, Fluka Analytical, Švajcarska);
  - Standard Si (TraceCERT, Fluka Analytical, Švajcarska);
  - Standard P (TraceCERT, Fluka Analytical, Švajcarska);
  - Standard Hg (TraceCERT, Fluka Analytical, Švajcarska);
- ❖ Folin-Ciocalteu reagens (Sigma Co. St. Louis, SAD);
- ❖ Metanol, p.a. čistoće (Sigma Co. St. Louis, SAD);
- ❖ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20 % rastvor (Merck, Nemačka);
- ❖ Galna kiselina (Mallinckrodt, Nemačka);
- ❖ DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma Co. St. Louis, SAD);
- ❖ Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) (Sigma Co. St. Louis, SAD);
- ❖ K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Merck, Nemačka);
- ❖ ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina)) (Sigma Co. St. Louis, SAD);
- ❖ Amonijum acetatni pufer (NH<sub>4</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), pH 7,0 (Merck, Nemačka);
- ❖ Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Merck, Nemačka);
- ❖ CuCl<sub>2</sub>, 0,01 M (Merck, Nemačka);
- ❖ K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 1 % rastvor (Merck, Nemačka);
- ❖ Fosfatni pufer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pH 6,6 (Zorka, Republika Srbija);
- ❖ CCl<sub>3</sub>COOH, 10 % rastvor (Merck, Nemačka);
- ❖ FeCl<sub>3</sub>, 0,1 % rastvor (Sigma Co. St. Louis, SAD);
- ❖ Askorbinska kiselina (Sehrlau, Nemačka);
- ❖ Streptomycin (Bio-Rad, Mađarska);
- ❖ Hloramfenikol (Biolab, Mađarska);
- ❖ Mueller-Hintonov agar – hranljiva podloga (Difco Laboratories, SAD);
- ❖ Sterilni mikrodiskovi prečnika 12 mm (Antibiotica Test Blattchen, Schleicher and Schuell, Nemačka);

- ❖ Amifostin VR-2721 (S-2[3-aminopropilamino]-etilfosfotioična kiselina), 98 % rastvor (Marligen-Biosciences, SAD);
- ❖ Mitomicin C (MMC) (Bristol-Myers Squibb, SAD);
- ❖ RPMI 1640 hranljiv medijum (RPMI 1640 Medium + GlutaMAX + 25 mM HEPES) (Invitrogen-Gibco-BRL, Austrija);
- ❖ Citohalazin B (Invitrogen-Gibco-BRL, SAD);
- ❖ NaCl, 0,9 % rastvor (Merck, Austrija);
- ❖ KCl, 0,56 % rastvor (Merck, Austrija);
- ❖ Gimza boja, 2 % rastvor (Sigma Aldrich, Nemačka);
- ❖ Neostigmin bromid (Sigma Co. St. Louis, SAD);
- ❖ DMSO (dimetilsulfoksid) (Sigma Aldrich, Nemačka);
- ❖ BuTC (butiriltioholin-jodid) (Sigma Co. St. Louis, SAD);
- ❖ DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoat)) (Sigma Co. St. Louis, SAD).

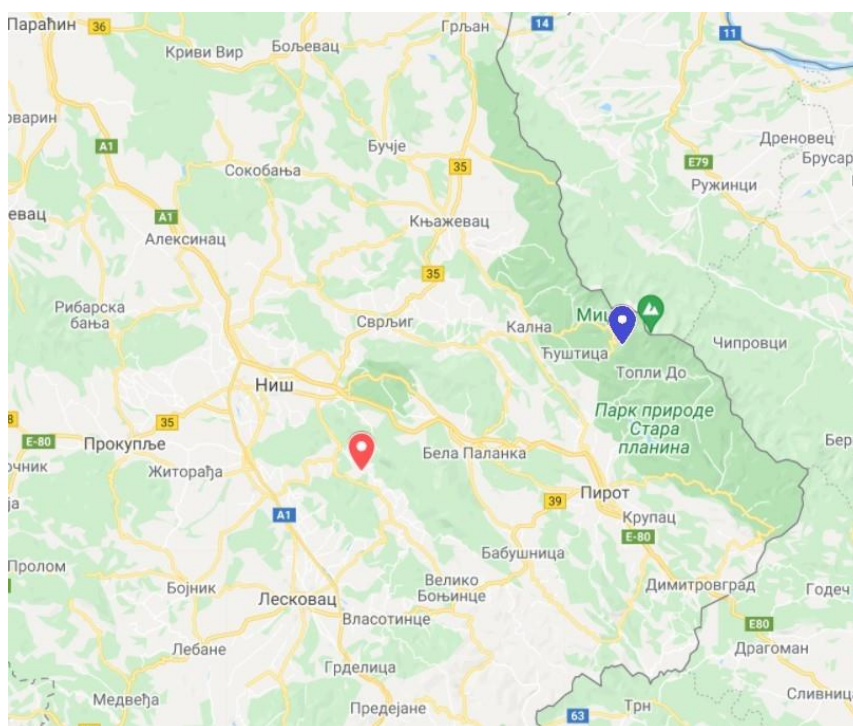
### 2.3. Lišajevski materijali

Lišaj *R. capitata* sakupljen je u maju 2015. godine sa silikatne stene na Staroj planini, na vrhu Babin Zub (nadmorska visina od 1650 m; koordinate 43°22' GŠ, 22°36' GD). Lišajevi *P. horizontalis* i *C. rangiformis* sakupljeni su u septembru 2015. godine u šumi cera (*Quercus cerris*) u selu Duga poljana na obroncima Suve planine (492 m nadmorske visine; koordinate 43°11' GŠ, 22°04' GD). Herbarski vaučeri se nalaze u Herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu (Tabela 6). Identifikaciju lišaja izvršio je prof. dr Bojan Zlatković sa Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

**Tabela 6.** Lokacija sakupljanja lišajeva, broj deponovanog vaučera i prinos (%) acetonskog ekstrakta (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija SD)

Vrsta lišaja	Lokalitet	Podloga	Broj vaučera	Prinos ekstrakta (%)
<i>R. capitata</i>	Stara Planina (Babin zub)	Stena crveni pešćar, silikat	9374	6,4 $\pm$ 0,5
<i>P. horizontalis</i>	Duga poljana (Suva planina)	Podnožje cera ( <i>Quercus cerris</i> ) na zemlji među mahovinom	10890	1,2 $\pm$ 0,1 (talus) 0,6 $\pm$ 0,05 (apotecije)
<i>C. rangiformis</i>	Duga poljana (Suva planina)	Podnožje cera ( <i>Quercus cerris</i> ) na zemlji	10889	7,6 $\pm$ 0,5

Prikupljene vrste lišajeva, očišćene od svog domaćina, sušene su na vazduhu na mestu zaštićenom od svetlosti, tokom 10 dana. Nakon sušenja, od talusa lišaja *P. horizontalis* odvojena su plodonosna tela tzv. apotecije. Do početka eksperimentalnog rada, suv lišajevski materijal čuvan je na tamnom mestu i sobnoj temepraturi zaštićen od vlage.



**Slika 8.** Mapa lokaliteta sakupljanja lišajeva

● Babin Zub; ● Duga poljana

## 2.4. Priprema ekstrakata

Osušeni materijali odabranih vrsta lišajeva (po 10 g) sitno su sprášeni i ekstrahovani sa po 50 ml acetona i ostavljeni na ultrazvučnom kupatilu 30 minuta, a zatim 5 dana na mračnom mestu i sobnoj temperaturi. Ekstrakti su profiltrirani pomoću filter papira (bela traka). Suvi ekstrakti dobijeni su uparavanjem acetona pod sniženim pritiskom pomoću rotacionog vakuum uparivača, na temperaturi od 40 °C. Ekstrakcija je za svaku vrstu lišajeva urađena po tri puta. Dobijeni prinosi ekstrakcije prikazani su u Tabeli 6. Suvi acetonski ekstrakti su korišćeni za ispitivanje bioloških aktivnosti.

U svrhu pripreme uzoraka za HPLC i GC-MS analizu, suvi lišajevski materijali (po 2 g) su ekstrahovani sa po 10 ml odgovarajućeg rastvarača (aceton, dietil-etar, etil-acetat i dihlormetan) na ultrazvučnom kupatilu 30 minuta, i ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi i tamnom mestu. Ekstrakti su profiltrirani pomoću mikrofiltera sa veličinom pora od 0,45 µm u vijale za HPLC i GC-MS analizu.

## 2.5. HPLC analiza

HPLC analiza sa UV detekcijom primenjena je za identifikaciju komponenata ekstrakata lišajeva. Aparat je opremljen kvaternarnom pumpom, degazatorom, autosamplerom, termostatiranom kolonom i softverom Chemstation (Agilent Technologies). Analize su vršene na aparatu Agilent 1200 Series korišćenjem C18 kolone (Zorbax Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4,6×150 mm). Hromatografsko razdvajanje izvršeno je upotrebom sistema rastvarača metanol/dejonizovana voda/mravlja kiselina (80/20/0,2, v/v/v). Brzina protoka mobilne faze bila je 0,5 ml/min. U kolonu je pomoću autosamplera injektovano 5 µl rastvora uzorka. Kolona je termostatirana na temperaturi od 25 °C. Razdvojeni pikovi detektovani su primenom DAD detektora na 254 nm, a apsorpcioni spektri komponenata snimani su u opsegu talasnih dužina od 190 do 400 nm. Identifikacija komponenata je izvršena komparacijom retencionih vremena i UV spektara konstituenata sa standardima i prethodno izolovanim komponentama u eksperimentima snimanim pod istim uslovima.

## 2.6. GC-MS analiza

Hemijski sastav isparljivih komponenti ekstrakata izvršeno je GC-MS metodom. Analiza je vršena u triplikatu korišćenjem 7890/7000B GC-MS/MS tripl kvadrupol sistema u MS1 sken modu (Agilent Technologies) sa kapilarnom kolonom HP-5MS (5 %

fenilmetilsiloksan, 30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 μm). Za injektovanje uzorka korišćen je Combi PAL autosampler. Temperatura injektora i interfejsa bila je 250 i 300 °C, redom. Temperaturni program je započet sa temperaturom od 70 °C tokom 2,25 minuta, povećavajući linearno temperaturu do 300 °C (gradijent 5 °C u minuti), a zatim izotermalno održavan tokom poslednjih 10 minuta. Noseći gas bio je helijum sa brzinom protoka od 1 ml/min. Zapremina injektovanog uzorka bila je 2 μl, dok je odnos splita iznosio 5:1. Bekfleš u trajanju od 1,89 minuta na 280 °C, sa pritiskom helijuma od 50 psi (3,4 bar). Uslovi za MS bili su: jonizacioni napon od 70 eV, opseg masa 50-650, vreme skenova 0,32 sekundi.

Procentualni sastav isparljivih komponenti izračunat je na osnovu površine TIC pikova. Određivanje komponenata izvršeno je pomoću AMDIS softvera (The Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, Ver. 2.1, DTRA/NIST, 2011) korišćenjem linearnih retencionih indeksa (RI) izračunatim na osnovu retencionih vremena standardne serije n-alkana (C<sub>8</sub> – C<sub>40</sub>) snimljenim pod istim uslovima kao i uzorci. Identifikacija je izvršena komparacijom dobijenih RI sa podacima iz dostupnih biblioteka (NIST Chemistry WebBook) (Dool i Kratz, 1963; Stein, 1990; Adams, 2007) i upoređivanjem masenih spektara komponenata lišajeva sa literaturnim (Wiley 6, NIST02, MassFinder 2.3) (Stein, 1990). U Prilogu su dati TIC hromatogrami ispitivanih ekstrakata i maseni spektri pojedinih komponenti lišajeva.

## 2.7. ICP-OES analiza

ICP-OES analiza je tehnika optičke emisije spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom koju smo koristili za detekciju 20 metala (Ca, K, Mg, Na, P, Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Si, V i Zn) u odabranim vrstama lišajeva.

U postupku pripreme uzoraka za analizu odmereno je i sprášeno u avanu po 1 g suvog lišaja, a zatim tretirano sa 30 ml koncentrovane (95 %) HNO<sub>3</sub> i ostavljeno 48 sati (uz povremeno mešanje). Uzorci su zagrevani na rešou sve do potpunog gubitka azotovih para, odnosno dobijanja bistrog rastvora. Postupak je ponovljen sa još 20 ml konc. HNO<sub>3</sub>. Nakon potpune mineralizacije, dobijeni rastvori su filtrirani i dopunjeni dejonizovanom vodom do ukupne zapremine od 50 ml.

Sva merenja su izvedena u triplikatu. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). Pearsonova studija korelacije i hijerarhijska klaster analiza rađene su pomoću statističkog programa IBM SPSS 20 (SAD).

### **2.7.1. Karakteristike ICP spektrometra serije iCAP 6000**

ICP-OES analiza je sprovedena pomoću optičkog emisionog spektrometra sa indukovano spregnutom plazmom serije iCAP 6000 (Thermo Scientific, Cambridge, UK) koji kombinuje Echelle optički dizajn (ešeletna rešetka i sferno ogledalo za odličnu optičku rezoluciju) i CID (charge injection device) detektor sa obezbeđenim hlađenjem kamere na -45 °C. Primenjen opseg talasne dužine je od 166,250 nm (što omogućava određivanje Al na 167,120 nm, a to je i njegova najosetljivija linija) do 847,000 nm (što omogućava određivanje K na 766,490 nm i Na na 818,326 nm).

Upotrebom radiofrekventnog (RF) generatora sa iskorišćenjem snage koja je veća od 78 % i frekvencije od 27,12 MHz obezbeđena je induktivno kuplovana plazma. Uzorci se unose pomoću staklenog koncentričnog nebulajzera i staklene komore za raspršivanje. Opseg brzine pumpe je od 0-125 obrtaja u minuti. Pomoću *Stand by mode*-a obezbeđeno je sprečavanje oštećenja pumpe nakon gašenja plazme. Protok gasa raspršivača regulisan je manuelno u intervalu od 0 do 0,4 MPa.

Pomoću operativnog softvera iTEVA podešeni su sledeći uslovi rada: brzina peristaltičke pumpe 100 obrtaja/min, brzina pumpe za analizu 50 obrtaja/min, snaga RF generatora 1150 W, protok gasa raspršivača 0,7 l/min, protok gasa rashladne tečnosti 12 l/min, pomoćni protok gasa 0,5 l/min, aksijalno posmatranje plazme, i vreme ispiranja od 30 s. Sistem je konstantno u atmosferi argona ili azota. Aksijalno posmatranje plazme je za primene koje zahtevaju niži limit detekcije (LOD). Limit detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektovati, ali ne i kvantifikovati.

Talasne dužine određivanih elemenata (nm): Al – 396,152; B – 249,773; Ba – 455,403; Ca – 393,366; Cd – 214,438; Co – 228,616; Cr – 357,969; Cu – 324,754; Fe – 259,940; Hg – 184,950; K – 766,490; Mg – 279,553; Mn – 257,610; Na – 589,592; Ni – 231,604; P – 213,618; Pb – 220,353; Si – 288,158; V – 292,402; Zn – 213,856.

## **2.8. Antioksidativna aktivnost acetonskih ekstrakata ispitivanih lišajeva**

### **2.8.1. Određivanje „scavenging“ antioksidativnog slobodno-radikalskog kapaciteta prema DPPH radikalu**

Za analizu je uzeto 1,5 ml metanolnog rastvora DPPH<sup>•</sup> radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal), koncentracije 100 µmol/l, i 0,2 ml metanolnog rastvora acetonskog ekstrakta (koncentracije 15 mg/ml), a zatim je dodat metanol do ukupne zapremine od 4 ml.

Nakom mešanja, rastvor je ostavljen 30 minuta u mraku, a zatim je na spektrometru merena apsorbanca na talasnoj dužini od 515 nm. Kao slepa proba korišćen je metanol. Sve analize rađene su u triplikatu. Sveže pripremljeni rastvor DPPH ima ljubičastu boju koja nakon redukcije prelazi u bezbojni proizvod (2,2-difenil-1-hidrazin) što rezultira smanjenjem apsorbanacije. Kapacitet hvatanja radikala detemisan je kalibracionom krivom korišćenjem Troloksa kao pozitivne kontrole u koncentraciji od 1 do 16  $\mu\text{mol/l}$ , a izražava se u  $\mu\text{g}$  Troloks ekvivalenta (TE) po mg suvog ekstrakta ( $\mu\text{g TE/mg SE}$ ). Aktivnost hvatanja DPPH $\cdot$  radikala se izražava sledećom jednačinom:

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

gde je  $A_0$  – apsorbanca kontrolnog uzorka,  $A_1$  – apsorbanca rastvora u kome se nalazi ispitivani ekstrakt lišaja, i izražava se kao procenat inhibicije DPPH radikala.  $\text{IC}_{50}$  vrednost se izražava kao količina ekstrakta lišaja potrebna da se smanji početna koncentracija DPPH za 50 % korišćenjem eksponencijalne krive, i izračunava se u jedinicama  $\mu\text{g/ml}$ .

### **2.8.2. Određivanje "scavenging" antioksidativnog slobodno radikalskog kapaciteta prema ABTS radikal**

ABTS $^{\cdot+}$  radikal (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfat)) nastaje u reakciji oksidacije sa kalijum persulfatom ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), i naknadnom inkubacijom u mraku od 12 do 16 sati. Pre početka analize, 7 ml rastvora ABTS $^{\cdot+}$  radikala je rastvoreno u metanolu za dobijanje apsorbanace od  $0,70 \pm 0,02$  jedinica na talasnoj dužini od 734 nm. Metanolni rastvor acetonskog ekstrakta lišaja u zapremini od 0,05 ml, koncentracije 15 mg/ml, pomešan je sa 1,8 ml razblaženog rastvora ABTS $^{\cdot+}$  radikala i rastvoren u metanolu do ukupne zapremine od 4 ml. Nakon stajanja rastvora tokom 6 minuta na sobnoj temperaturi, redukcija apsorbanace je merena na 734 nm. Rezultati su izraženi kao  $\mu\text{g}$  Troloks ekvivalenta po mg suvog ekstrakta ( $\mu\text{g TE/mg SE}$ ).

### **2.8.3. Odredjivanje antioksidativne aktivnosti merenjem ukupne redukcione moći (TRP metoda, total reducing power)**

Metoda određivanja ukupne redukcione moći zasniva se na sposobnosti antioksidansa da redukuje gvožđe (III) heksacijanat u gvožđe (II) heksacijanat pri čemu dolazi do porasta apsorbanace reakcione smeše na talasnoj dužini od 700 nm. Za analizu je pomešano 0,01 ml metanolnog rastvora acetonskog ekstrakta (koncentracije 15 mg/ml), 1 ml 1% rastvora kalijum



heksacijanoferata, 1 ml fosfatnog pufera (pH 6,6) i 1,69 ml vode. Rastvor je ostavljen 30 minuta na 50 °C a zatim je dodat 1 ml 10 % rastvora trihlorsirćetne kiseline i 0,6 ml 0,1 % rastvora gvožđe (III) hlorida. Kao standard korišćena je askorbinska kiselina, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta askorbinske kiseline (AAE) po mg suvog ekstrakta (mg AAE/mg SE).

#### **2.8.4. Određivanje ukupnog sadržaja fenola (TPC, total phenolic content)**

Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja određen je korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa. Za analizu je uzeto 0,05 ml metanolnog rastvora acetonskog ekstrakta lišajeva (koncentracije 15 mg/ml) i pomešano sa 0,2 ml Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 60 sekundi dodato je 2 ml 20 % vodenog rastvora natrijum karbonata i rastvoreno u destilovanoj vodi do ukupne zapremine od 7,55 ml. Rastvor je ostavljen 30 minuta na sobnoj temperaturi bez prisustva svetlosti, a zatim je merena apsorbanca na 750 nm. Sve analize su izvedene u triplikatu. Galna kiselina je korišćena za izračunavanje standardne krive, a rezultati su izraženi kao µg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po mg suvog ekstrakta (µg GAE/mg SE).

#### **2.8.5. CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) analiza**

Ova metoda se zasniva na redukciji CUPRAC reagensa – helatnog kompleksa bakar (II) neokuproina do bakar (I) neokuproina u prisustvu nekog antioksidansa. Za analizu je pomešano 0,05 ml metanolnog rastvora acetonskog ekstrakta lišaja, 1 ml amonijum acetatnog pufera (pH 7,0), 1 ml rastvora neokuproina, 1 ml rastvora bakar (II) hlorida i dodata je destilovana voda do ukupne zapremine od 4 ml. Dobijeni rastvor je ostavljen 30 minuta na sobnoj temperaturi a zatim je merena apsorbanca na talasnoj dužini od 450 nm. Slepa proba je bila smeša reagenasa bez dodatog rastvora ekstrakta. Analize su izvedene u triplikatu. Troloks je korišćen kao standard a rezultati su izraženi kao µg Troloks ekvivalenta po mg suvog ekstrakta (µg TE/mg SE).

### **2.9. Određivanje antimikrobne aktivnosti acetonskih ekstrakata ispitivanih lišajeva**

Antimikrobna aktivnost acetonskih ekstrakata odabranih vrsta lišajeva ispitivana je na dve Gram-pozitivne (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* ATCC 6633) i tri Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella abony* NCTC 6017 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Analiza je sprovedena po propisima Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde (NCCLS).

Za određivanje antimikrobne aktivnosti korišćena je disk difuziona metoda. Zapremina od 0,1 ml bakterijske suspenzije ( $10^8$  ćelija po mililitru) dodata je u Mueller-Hinton agar, hranljivoj podlozi za bakterije. Prema uputstvima proizvođača, hranljiva podloga je pripremljena i izlivena u sterilisane Petrijeve šolje u zapremini od 20 ml dajući visinu sloja od 4 mm. Sterilni mikrodiskovi prečnika 12 mm impregnisani su sa po 0,05 ml rastvora acetonskog ekstrakta koncentracije 20 mg/ml, tako da je postignuta koncentracija od 1 mg ekstrakta po disku. Negativne kontrole su pripremljene upotrebom acetona. Kao pozitivna kontrola korišćeni su standardni diskovi hloramfenikola (30  $\mu$ g po disku prečnika 6 mm) i streptomicina (10  $\mu$ g po disku prečnika 6 mm). Temperatura inkubacije na čvrstoj podlozi bila je 37 °C tokom 24 sata. Antimikrobna aktivnost je procenjena merenjem prečnika zone (u milimetrima) inhibicije protiv testiranih bakterija. Sve bakterije su potpuno neosetljive na kontrolne diskove na kojima je nanet aceton. Antimikrobni test je izveden u triplicatu, a rezultati su izraženi u mm zone inhibicije kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

## **2.10. Ispitivanje uticaja acetonskih ekstrakata na formiranje mikronukleusa u limfocitima humane krvne plazme**

Uzorci koji su korišćeni za analizu dobijeni su od 5 zdravih muških osoba, koje nisu bile izložene genotoksičnim hemikalijama ili zračenju. Od svakog ispitanika uzeto je po dva alikvota od 5 ml venske krvi. Studija je bila u skladu sa etičkim kodeksom Svetske lekarske asocijacije (Helsinška deklaracija iz 1964. godine, revidirana 2002. godine).

Acetonski ekstrakti lišaja (u koncentracijama od 1,0, 2,0 i 3,0  $\mu$ g/ml) testirani su na *in vitro* zaštitni efekat na aberacije hromozoma u perifernim humanim limfocitima primenom CBMN testa. Test se bazira na korišćenju citohalazina B, koji su prethodno koristili Fenech i Morley (1993), ali sa nekim modifikacijama koje su opisane u radu od strane Stanković i saradnika (2007). Zabeležena je frekvencija i distribucija mikronukleusa (MN) u limfocitima humane krvne plazme. Kao pozitivna kontrola korišćen je amifostin VR-2721 (98 % S-2[3-aminopropilamino]-etilfosfotioična kiselina), fosforilirani derivat cisteamina, u koncentraciji od 1  $\mu$ g/ml. Alkilirajući agens, mitomicin C (MMC), pripremljen razređivanjem leka u fosfatnom puferu do koncentracije od 0,1  $\mu$ g/ml korišćen je kao negativna kontrola, koji povećava broj MN (klastogeni efekat). Mogući klastogeni, antiklastogeni ili modulacioni efekti ispitivanih jedinjenja utvrđeni su u odnosu na dejstvo ova dva agensa.

Sve kulture inkubirane su u termostatu na 37 °C tokom 19 sati. Tretman ispitivanih acetonskih ekstrakata lišajeva trajao je 19 sati (izračunato vreme potrebno da se ekstrakti lišaja

uneti u organizam metabolišu i izluče iz organizma). Nakon ispiranja svih kultura čistim medijumom, prenete su u 5 ml sveže napravljenog RPMI 1640 hranljivog medijuma (RPMI 1640 Medium + GlutaMAKS + 25 mM HEPES) i inkubirane dodatna 72 sata.

Svaka kultura sadržala je  $2 \times 10^6$  ćelija limfocita u 5 ml RPMI 1640 hranljive podloge. Jedan sat nakon iniciranja ćelijske stimulacije, ekstrakti lišaja rastvoreni u vodi dodati su uzorcima. Ocenjena je učestalost spontano nastalog MN u kontrolnim uzorcima.

Citohalazin B u koncentraciji od 6  $\mu\text{g/ml}$  dodat je uzorcima nakon 44 h, a kulture limfocita su se inkubirale još 24 sata. Dodatkom citohalazina B, ćelijama je blokiran ulazak u citokinezu. Posle 72 sata, rastvor je centrifugiran (1200 obrtaja u minuti), zatim su ćelije isprane sa 0,9 % NaCl, ponovo centrifugirane i tretirane hipotoničnim rastvorom (0,56 % KCl + 0,9 % NaCl, u odnosu 1:1, v/v). Suspenzija ćelija je fiksirana u rastvoru metanola i sirćetne kiseline (3:1) i isprana tri puta fiksatorom. Preparati su osušena na vazduhu i obojeni 2 % rastvorom Gimza boje. Za procenu učestalosti mikronukleusa prebrojano je 1000 dvojedarnih ćelija po svakom uzorku, po kriterijumima Countryman i Heddle (1976) i Fenech i Morely (1993). Podaci za svaki tretman izraženi su kao učestalost mikronukleusa na 1000 dvojedinih ćelija.

Statistička analiza izvršena je pomoću softverskog paketa Origin verzije 7.0. Statistička značajnost procenjena je analizom varijanse (One way ANOVA) praćena Tukey testom. Statistička razlika se smatrala značajnom pri  $p < 0,01$  i  $p < 0,05$ . Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

### **2.11. Ispitivanje uticaja acetonskih ekstrakata na aktivnost serumske holinesteraze**

Enzim holinesteraza katalizuje hidrolizu butiriltioholina (BuTC) do tioholina, koji reaguje sa ditio-nitro benzoevom kiselinom (DTNB), delujući kao hromogen što rezultira stvaranjem žute boje. Aktivnost je određena spektrofotometrijski korišćenjem Konelab 20 analizatora sa termostatiranim ćelijama dužine 7 mm, na talasnoj dužini od 405 nm (Stankov Jovanović i saradnici, 2007). Ispitivanje je urađeno sa slepom probom, uzorkom i referentnim standardom. Kao referentni standard korišćen je rastvor neostigmin bromida u koncentraciji od 200  $\mu\text{l/ml}$ .

Acetonski ekstrakti rastvoreni u DMSO u koncentraciji od 1 i 10 mg/ml korišćeni su za ispitivanje uticaja na aktivnost serumske holinesteraze. Za analizu je pomešano 10  $\mu\text{l}$  rastvora uzorka, 10  $\mu\text{l}$  humanog seruma, prethodno rastvorenog u fosfatnom puferu u odnosu 1:9 (v/v),

i 160  $\mu$ l fosfatnog pufera. Rastvor je ostavljen 10 min na 37 °C, a zatim je dodat rastvor ditio-nitro benzoeve kiseline (10  $\mu$ L). Nakon 60 sekundi, u rastvor je dodato 10  $\mu$ l butiriltioholina.

Rezultati su predstavljeni kao % inhibicije ili aktivacije holinesteraze iz humane serumske plazme:

$$\% \text{ inhibicije/aktivacije} = ((I_x - I_0)/I_0) \times 100,$$

gde je  $I_0$  apsorbancija reakcione smeše bez uzorka i  $I_x$  apsorbancija u prisustvu ispitivane supstance.

### **3. REZULTATI I DISKUSIJA**

#### **3.1. HPLC analiza acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakata odabarnih vrsta lišajeva**

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakata ispitivanih vrsta lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis*, primenom HPLC metode, prikazani su u Tabelama 7 i 8. Identifikacija komponenata postignuta je poređenjem retencionih vremena i UV spektara konstituenata sa standardima i prethodno izolovanim komponentama pod identičnim eksperimentalnim uslovima. Odabrani hromatogrami prikazani su na Slikama 9-12 i 14, dok su ostali hromatogrami kao i UV spektri identifikovanih komponenti dati u Prilogu.

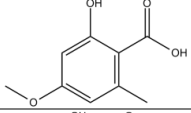
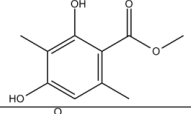
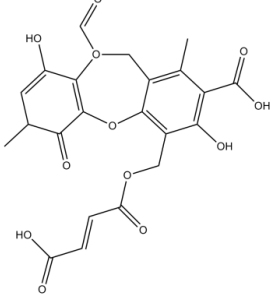
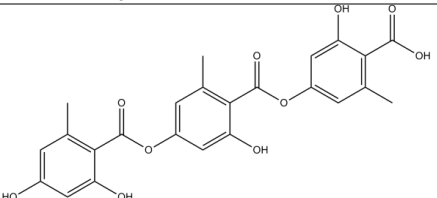
**Tabela 7.** Relativna zastupljenost komponenata ekstrakata lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis* (izražena kao procenat ukupne površine hromatograma na 254 nm)

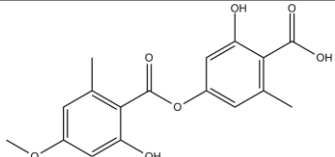
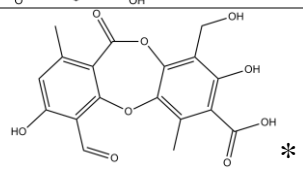
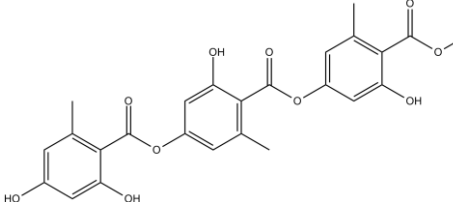
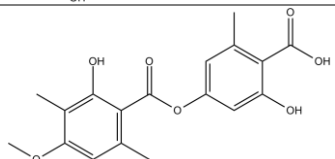
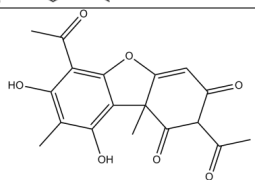
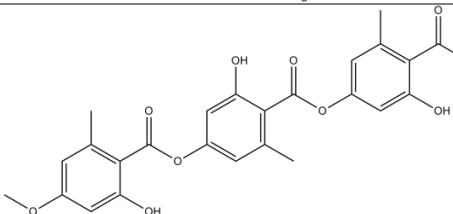
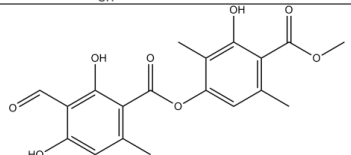
Komponenta	RC (%)				PH (%)				PHT (%)				PHA (%)				CR (%)			
	A	EA	E	D	A	EA	E	D	A	EA	E	D	A	EA	E	D	A	EA	E	D
1	27,2	7,9	3,1	9,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	2,9	1,5	4,0
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	2,4	2,5	0,6
4	-	-	-	-	0,7	1,3	2,1	0,2	0,6	1,1	6,4	0,6	14,2	1,0	1,1	0,1	-	-	-	-
5	59,9	68,2	52,1	69,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	-	0,4
7	-	-	-	-	1,6	5,6	4,2	0,6	93,4	87,4	70,3	93,0	22,7	3,2	5,5	1,0	-	-	-	-
8	9,6	20,5	12,1	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	2,8	2,6	2,7	13,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	96,6	69,5	68,0	84,0	-	-	-	-	56,1	86,4	80,9	93,9	-	-	-	-
11	0,3	0,6	0,1	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97,2	89,2	95,1	93,9

RC – *R. capitata*, PH – *P. horizontalis*, PHT – *P. horizontalis* (talus), PHA – *P. horizontalis* (apotecije), CR – *C. rangiformis*; Ekstrakti: A – acetonski, EA – etil-acetatni, E – etarski, D – dihlormetanski. Komponente: 1 – everninična kiselina (*everninic acid*), 2 – atrarična kiselina (*atraric acid*), 3 – fumarprotocetrarična kiselina (*fumarprotocetraric acid*), 4 – giroforna kiselina (*gyrophoric acid*), 5 – **evernična kiselina** (*evernic acid*), 6 – derivat protocetrarične kiseline (*protocetraric acid*), 7 – **metil-giroforat** (*methyl gyrophorate*), 8 – obtusinska kiselina (*obtusatic acid*), 9 – usninska kiselina (*usnic acid*), 10 – **tenuiorin** (*tenuiorin*), 11 – **atranorin** (*atranorin*).

Ekstrakti lišaja *R. capitata* okarakterisani su najraznovrsnijim hemijskim sastavom u pogledu klasa jedinjenja, pri čemu depsidi predstavljaju najzastupljeniju klasu identifikovanih jedinjenja. Depsid evernična kiselina identifikovana je kao komponenta sa najvećim procentnim sadržajem u svim ekstraktima lišaja *R. capitata* (52,1 – 69,4 %). Depsid obtusinska kiselina i monoaromatično jedinjenje everninična kiselina drugi su po redu zastupljenosti u svim ekstraktima osim dihlormetanskog. U etil-acetatnom i etarskom ekstraktu obtusinska kiselina je prisutna u većem procentu (20,5 i 12,1 %, redom) nego everninična kiselina (7,9 i 3,1 %, redom), dok je kod acetonskog i dihlormetanskog ekstrakta sadržaj everninične kiseline veći (27,2 i 9,9 %, redom) od obtusinske kiseline (9,6 i 2,8 %, redom). Podjednak udeo dibenzofurana usninske kiseline (2,6 – 2,8 %) i depsida atranorina (0,1 – 0,6 %) prisutan je u acetonskom, etil-acetatnom i etarskom ekstraktu. Sa druge strane, dihlormetanski ekstrakt okarakterisan je većim procentom atranorina (4,0 %) i usninske kiseline (13,9 %), koja ujedno predstavlja drugu zastupljenu komponentu dihlormetanskog ekstrakta.

**Tabela 8.** Identifikovane komponente, njihovi apsorpcioni maksimumi UV spektra, klase i hemijske strukture komponenata

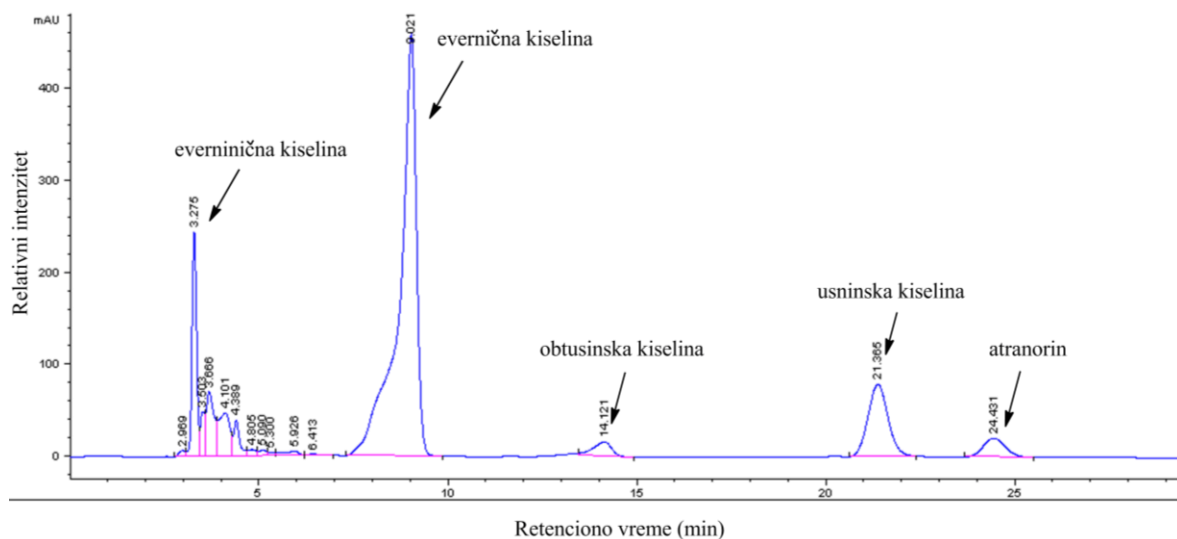
Komponenta	Apsorpcioni maksimumi (nm) UV spektra	Klasa komponente	Hemijska struktura
<i>Everninična kiselina</i>	220, 260, 300	monociklično aromatično jedinjenje	
<i>Atrarična kiselina</i>	220, 270, 305	monociklično aromatično jedinjenje	
<i>Fumarprotocetrarična kiselina</i>	212, 238, 314	depsidon	
<i>Giroforna kiselina</i>	214, 271, 305	depsid	

<i>Evernična kiselina</i>	214, 269, 306	depsid	
<i>Derivat protocetrarične kiseline</i>	210, 238, 312	depsidon	
<i>Metil-giroforat</i>	216, 271, 308	depsid	
<i>Obtusinska kiselina</i>	214, 274, 303	depsid	
<i>Usninska kiselina</i>	220, 290, S 325	dibenzofuran	
<i>Tenuiorin (peltigerin)</i>	207, S 216, 267, 307	depsid	
<i>Atranorin</i>	210, 252, 312	depsid	

\* Hemijska struktura protocetrarične kiseline

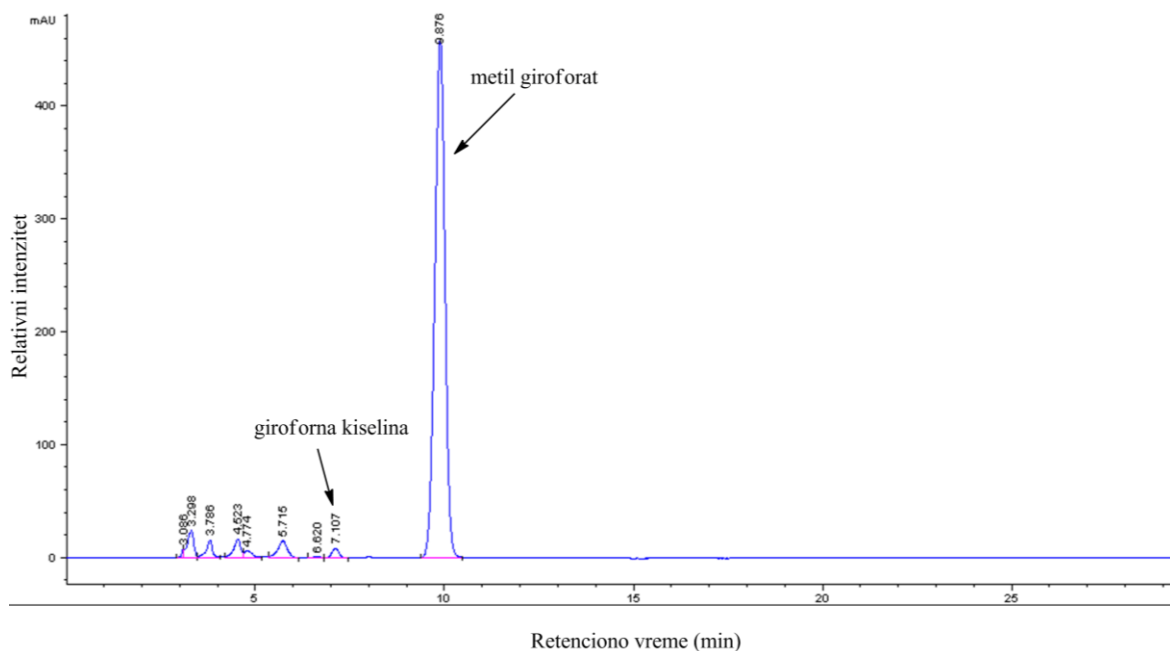
Prethodna ispitivanja od strane Moreira i saradnika (2015) pokazala su da su usninska kiselina, evernična kiselina, obtusinska kiselina i atranorin zastupljeni u mnogim vrstama roda *Ramalina*. Cansaran i saradnici (2007) dokazali su prisustvo usninske kiseline u acetonskom ekstraktu *R. capitata* sa udelom od 1,3 %, što je u saglasnosti sa našim rezultatima.





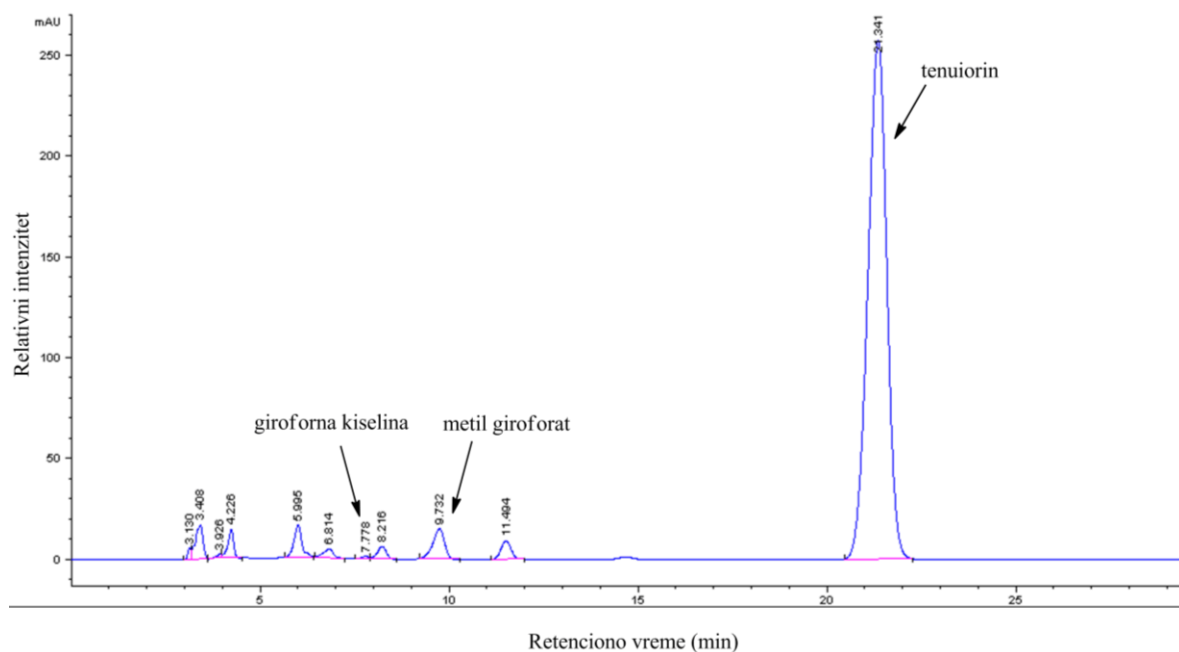
**Slika 9.** HPLC hromatogram dihlormetanskog ekstrakta lišaja *R. capitata*

Sve identifikovane komponente ekstrakata lišaja *P. horizontalis* spadaju u klasu depsidona. S obzirom da je *P. horizontalis* ispitivan kao celokupni lišaj, i u vidu njegovih delova – talusa i apotecija, upoređenjem rezultata hemijskog sastava može se zaključiti da se hemijski sastav talusa i apotecija razlikuje, dok je hemijski sastav celokupnog lišaja vrlo sličan sastavu apotecija (Slika 13).



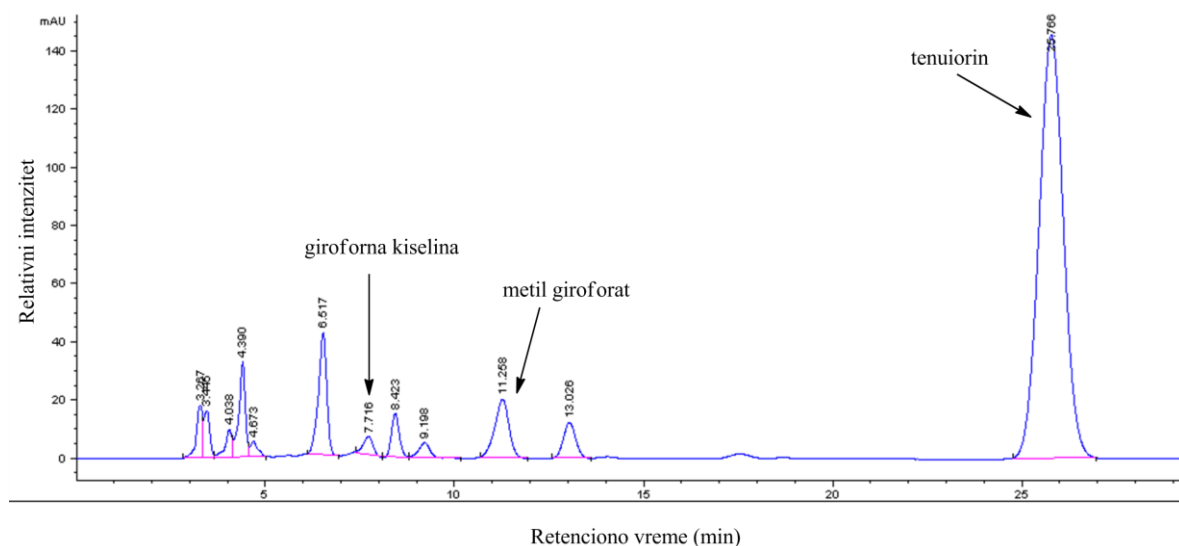
**Slika 10.** HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta talusa *P. horizontalis*

Kod svih ispitivanih ekstrakata identifikovano je prisustvo tridepsida giroforne kiseline i njenog metil derivata – metil-giroforata. Sadržaj giroforne kiseline je u svim ekstraktima približan (0,1 – 2,1 %), osim kod etarskog ekstrakta talusa i acetonskog ekstrakta apotecija gde je zastupljenost ovog depsida veća (6,4 % i 14,2 %, redom). Dobijeni hromatogrami analiziranih ekstrakata talusa lišaja *P. horizontalis* pokazuju da najintenzivniji pik pripada metil-giroforatu (70,3 – 93,4 %), pri čemu je njegov sadržaj najveći u acetonskom i dihlormetanskom ekstraktu sa udelom od 93,4 % i 93,0 %, redom. Sa druge strane, metil-giroforat je u ostalim ekstraktima celokupnog lišaja *P. horizontalis* i apotecija prisutan u znatno manjem procentnom sadržaju (0,6 – 5,6 %), osim u acetonskom ekstraktu apotecija gde je relativni udeo metil-giroforata 22,7 %.

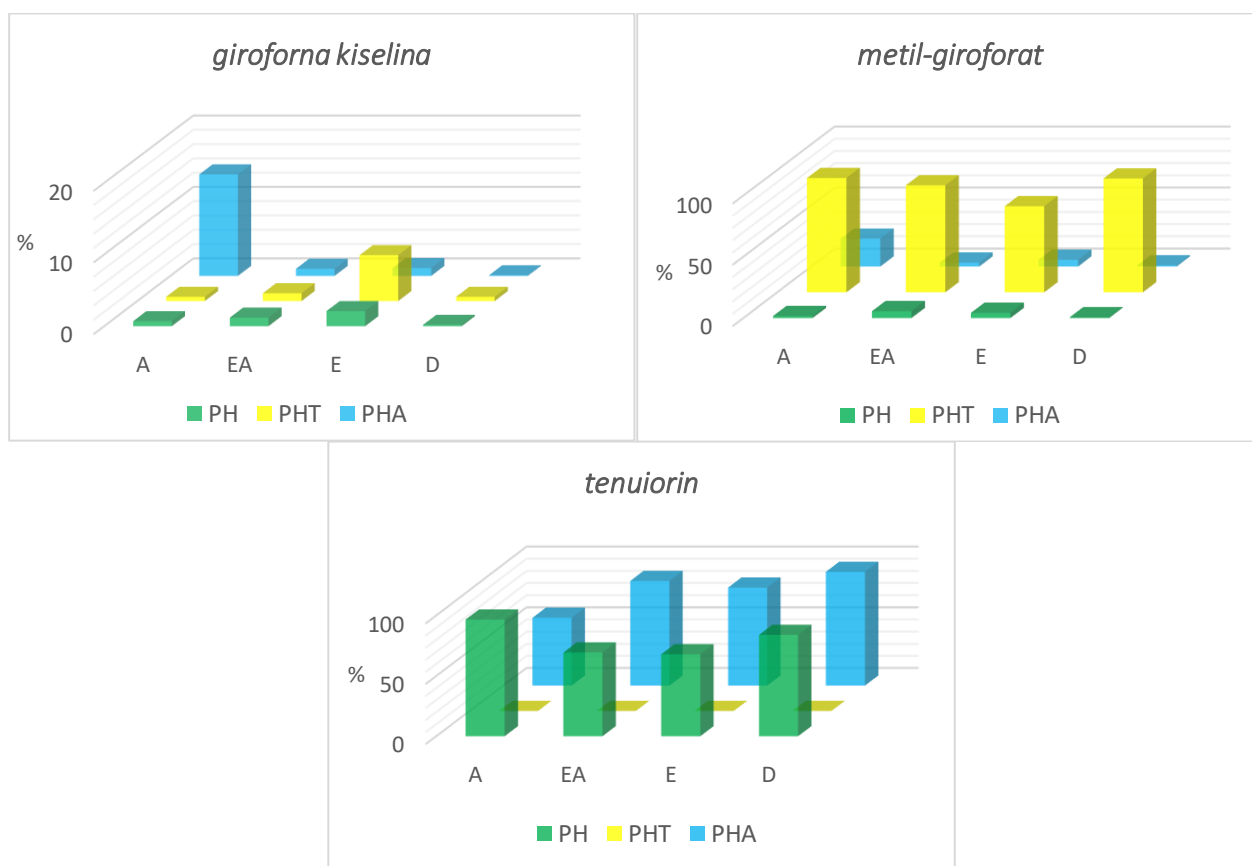


**Slika 11.** HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*

Najzastupljenija komponenta svih ispitivanih ekstrakata apotecija i celokupnog lišaja je tridepsid tenuiorin. Acetonski ekstrakt celokupnog lišaja sačinjava čak 96,6 %, dihlormetanski 84,0 %, etil-acetatni 69,5 % i etarski ekstrakt 68,0 % tenuiorina. U slučaju apotecija zastupljenost tenuiorina u dihlormetanskom je 93,9 %, etil-acetatnom 86,4 % i etarskom ekstraktu 80,9 %, dok je u acetonskom ekstraktu nešto manje zastupljen sa udelom od 56,1 %. Tenuiorin nije prisutan ni u jednom od ispitivanih ekstrakata talusa.



**Slika 12.** HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*

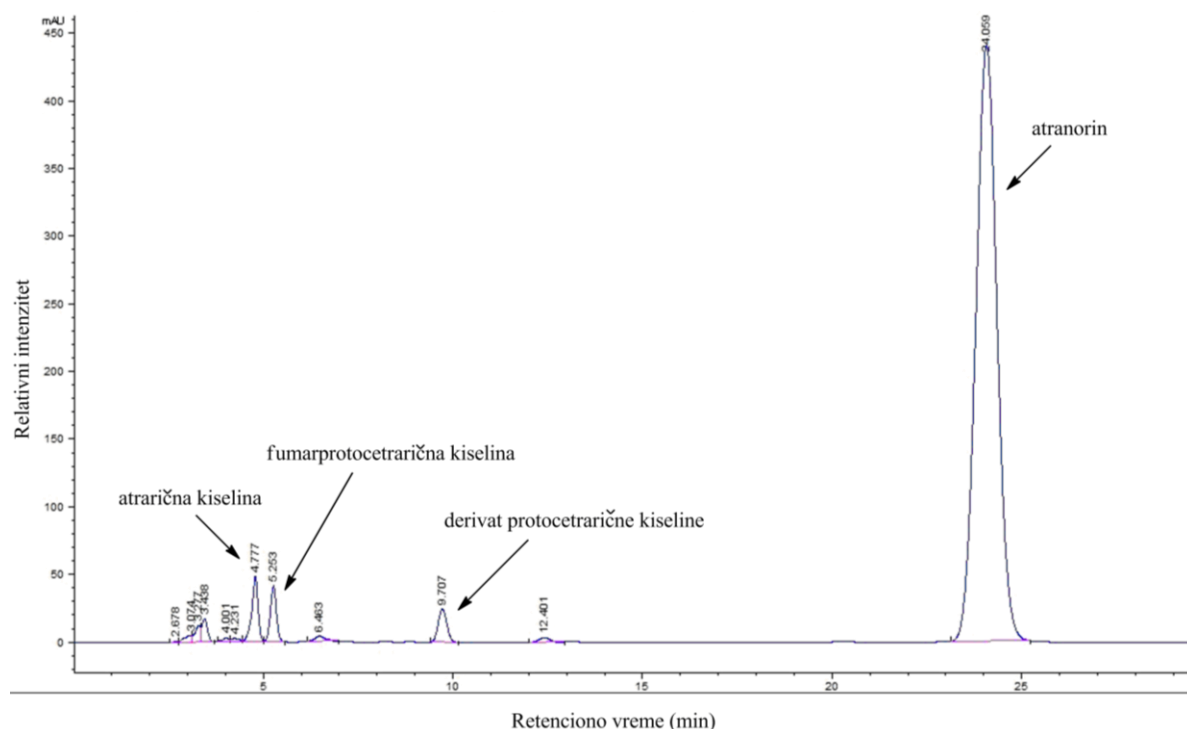


**Slika 13.** Sadržaj sekundarnih metabolita u ispitivanim ekstraktima lišaja *P. horizontalis*. (PH – celokupni lišaj, PHT – talus, PHA – apotecije; A – acetonski ekstrakt, EA – etil-acetatni ekstrakt, E – etarski ekstrakt, D – dihlormetanski ekstrakt)

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim izveštajem o hemijskom sastavu lišaja *P. horizontalis*, u kojem je lišaj okarakterisan prisustvom tenuiorina, metil-giroforata i giroforne kiseline (Benespero i Tretiach, 2004).

Ispitivani ekstrakti lišaja *C. rangiformis* sastoje se od depsida atranorina koji je kao glavna komponenta zastupljen u značajnom procentu (89,2 – 97,2 %). Manje zastupljene komponente su monoaromatična lišajevska kiselina, atrarična kiselina, koja je u uzorcima prisutna sa 0,5 do 4,0 %, i depsidon fumarprotocetrarična kiselina (0,3 do 2,5 %). Na osnovu UV spektra, identifikovano je prisustvo derivata protocetrarične kiseline koji je zastupljen jedino u etil-acetatnom (2,1 %) i dihlormetanskom (0,4 %) ekstraktu lišaja *C. rangiformis*.

Prethodna istraživanja Pino-Bodasa i saradnika (2017) pokazuju da su atranorin (kao glavna komponenta), fumarprotocetrarična kiselina i protocetrarična kiselina metaboliti prisutni u acetonskom ekstraktu lišaja *C. rangiformis*. Huneck i saradnici (2004) dokazali su prisustvo rangiformne i norrangiformne kiseline, međutim, ove alifatične kiseline ne apsorbuju u UV oblasti, tako da se pomoću HPLC metode ne mogu detektovati.



**Slika 14.** HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*

### **3.2. GC-MS analiza acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakata odabarnih vrsta lišajeva**

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava isparljivih komponenti acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakata ispitivanih vrsta lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis*, prikazani su u Tabelama 9 i 10. Identifikacija je izvršena komparacijom eksperimentalnih retencionih indeksa sa literaturnim i upoređivanjem masenih spektara komponenata lišajeva sa masenim spektrima biblioteka. Odabrani TIC hromatogrami prikazani su na Slikama 15, 17-19 i 22, dok su ostali hromatogrami ispitivanih ekstrakata i maseni spektri pojedinih komponenti lišajeva predstavljeni u Prilogu.

**Tabela 9.** Relativna zastupljenost isparljivih komponenti ekstrakata lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis*

Komponenta	RC (%)				PH (%)				PHT (%)				PHA (%)				CR (%)			
	A	EA	E	DHM	A	EA	E	DHM	A	EA	E	DHM	A	EA	E	DHM	A	EA	E	DHM
1	28,3	7,6	11,6	4,8	18,9	7,0	13,9	4,8	22,6	21,8	23,5	22,8	22,7	21,8	17,4	21,6	-	tr	tr	tr
2	20,9	16,7	25,8	11,9	17,1	17,3	26,2	3,1	24,0	19,4	18,5	17,0	18,1	19,3	22,5	15,8	tr	tr	0,3	tr
3	-	2,4	3,4	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	tr	2,5	0,6
5	-	0,1	tr	0,2	1,3	0,4	1,4	tr	0,4	tr	3,8	tr	0,4	0,4	3,5	0,1	tr	tr	0,2	tr
6	-	0,1	-	0,2	tr	-	tr	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	10,6	4,3	7,9	9,1
7	5,3	tr	tr	0,1	tr	-	-	0,6	0,3	tr	-	1,3	0,6	tr	-	1,3	-	-	-	-
8	-	tr	-	tr	48,1	53,3	36,3	64,3	46,1	45,2	1,6	51,7	52,4	45,9	3,7	55,0	-	tr	tr	0,1
9	-	1,0	3,8	-	-	2,9	2,2	-	-	tr	-	-	-	tr	3,7	-	-	-	-	0,1
10	-	33,7	24,7	22,2	-	-	-	14,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	0,4	tr	0,2	1,4	0,4	0,5	tr	4,3	9,0	50,6	0,6	0,6	7,2	45,9	1,0	tr	-	-	tr
12	-	0,6	0,1	1,6	tr	tr	0,5	tr	0,2	0,6	-	tr	tr	1,5	-	tr	19,4	19,2	13,5	29,8
13	-	0,9	1,9	tr	-	1,6	1,9	0,3	-	tr	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	0,5	0,6
15	-	7,1	10,2	9,0	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	1,8	9,7	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
17	-	10,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	4,7	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	0,4	tr	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	tr

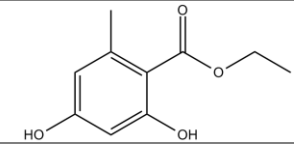
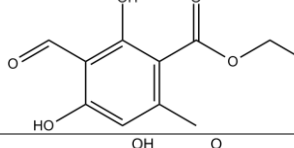
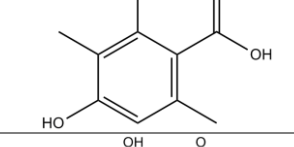
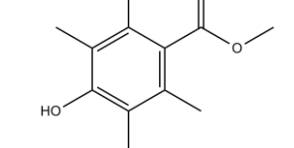
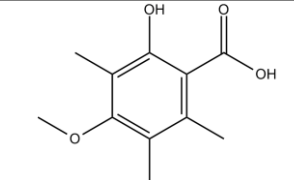




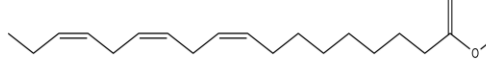
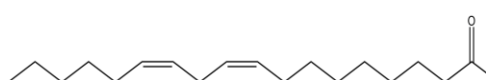




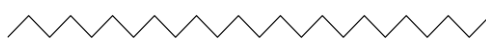
20	15,9	0,1	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	0,1	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-
22	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	0,7	-	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
24	-	1,1	-	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	0,1	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
26	-	0,1	0,1	0,7	-	0,5	4,9	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	0,4	-	0,2	2,4	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	0,1	-	-	2,2	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	0,1	-	-	1,4	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	0,1	-	-	1,4	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>31</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,6	73,0	73,8	58,5
32	-	0,1	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	0,1	-	-	1,1	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>34</b>	-	8,2	4,4	25,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	0,6	0,1	0,8	3,8	2,3	-	1,6	tr	tr	-	0,7	2,3	-	-	tr	-	tr	-	-
36	-	1,2	0,4	1,4	4,6	6,7	-	3,6	tr	tr	-	1,6	2,7	-	-	tr	-	tr	-	0,1
37	-	0,3	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Ukupno** 81,8 95,5 96,3 90,1 95,2 92,6 96,3 93,2 97,9 96,0 98,0 95,7 99,8 96,3 96,7 94,8 97,0 97,7 98,7 98,9  
RC – *R. capitata*, PH – *P. horizontalis*, PHT – *P. horizontalis* (talus), PHA – *P. horizontalis* (apotecije), CR – *C. rangiformis*; Ekstrakti: A – acetonski, EA – etil-acetatni, E – etarski, DHM – dihlormetanski; tr – sadržaj manji od 0,1 %.

**Tabela 10.** Identifikovane isparljive komponente u ispitivanim ekstraktima lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis*

RB	Jedinjenje	Sinonim	RI	RL	Hemijska struktura
1	3-Metoksi-5-metilfenol	Orcinol-monometil-etar	1319	1317 <sup>a</sup>	
2	1,3-Dihidroksi-5-metilbenzen	Orcinol	1370	1369 <sup>a</sup>	
3	3-Metoksi-2,5-dimetilfenol	$\beta$ -Orcinol-monometil-etar	1377	-	
4	1,3-dihidroksi-4,5-dimetilbenzen	$\beta$ -Orcinol	1418	1419 <sup>b</sup>	
5	<i>n</i> -Dodekanol	Lauril-alkohol	1472	1474 <sup>c</sup>	
6	2,6-Dihidroksi-4-metilbenzaldehyd	Atranol	1550	1549 <sup>b</sup>	
7	Metil-2-hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoat	Sparasol	1589	1590 <sup>a</sup>	
8	Metil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat	Metil-orselinat	1662	1661 <sup>a</sup>	
9	Metil-2-hidroksi-4-metoksi-3,6-dimetilbenzoat	-	1670	-	
10	2-Hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoeva kiselina	Everninična kiselina	1680	1685 <sup>d</sup>	
11	<i>n</i> -Dodecil-akrilat	Lauril-akrilat	1688	-	
12	Metil-2,4-dihidroksi-3,6-dimetilbenzoat	Atrarična kiselina	1709	1706 <sup>b</sup>	



13	Etil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat	Etil-orselinat	1735	-	
14	Etil-3-formil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat	Etil-hematomat	1752	1752 <sup>d</sup>	
15	2,4-Dihidroksi-3,6-dimetilbenzoeva kiselina	3-Metilorselinska kiselina	1760	-	
16	Metil-2,4-dihidroksi-3,5,6-trimetilbenzoat	Metil-3,5,6-trimetilrezorcilat	1768	1765 <sup>b</sup>	
17	2-Hidroksi-4-metoksi-3,5,6-trimetilbenzoeva kiselina	-	1778	-	
18	Metil-heksadekanoat	Metil-palmitat	1922	1921 <sup>e</sup>	
19	<i>n</i> -Heksadekanska kiselina	Palmitinska kiselina	1958	1958 <sup>a</sup>	
20	Metil-( <i>Z,Z</i> )-9,12-oktadekadienoat	Metil-linoleat	2092	2095 <sup>e</sup>	
21	Metil-( <i>Z</i> )-9-oktadekanoat	Metil-oleat	2098	2094 <sup>b</sup>	
22	Metil-( <i>Z,Z,Z</i> )-9,12,15-oktadekatrienoat	Metil-linolenat	2100	2100 <sup>f</sup>	
23	( <i>Z,Z</i> )-9,12-Oktadekadienska kiselina	Linolna kiselina	2130	2128 <sup>a</sup>	
24	( <i>Z</i> )-9-Oktadekanska kiselina	Oleinska kiselina	2140	2141 <sup>a</sup>	
25	<i>n</i> -Oktadekanska kiselina	Stearinska kiselina	2158	2159 <sup>a</sup>	
26	Butil-heksadekanoat	Butil-palmitat	2183	-	
27	Butil-oktadekanoat	Butil-stearat	2383	-	
28	<i>n</i> -Tetrakozan	-	2400	2400 <sup>b</sup>	

29	<i>n</i> -Pentakozan	-	2500	2500 <sup>b</sup>	
30	<i>n</i> -Heksakozan	-	2600	-	
31	(2 <i>S</i> )-2-[(2 <i>S</i> )-1-Metoksi-1-oksoheksadekan-2-il]butandionska kiselina	Rangiformna kiselina	2647	-	
32	1-(7-Acetil-4,6-dihidroksi-3,5-dimetil-2-benzofuranil)-2,4-pentandion	Dekarbousninska kiselina	2676	2671 <sup>g</sup>	
33	<i>n</i> -Heptakozan	-	2700	-	
34	2,6-Diacetil-3,7,9-trihidroksi-8,9b-dimetil-9b-dibenzofuran-1-on	Usninska kiselina	2740	2738 <sup>b</sup>	
35	Sterol 1 (derivat ergosterola)	-	2823	-	
36	Sterol 2 (derivat ergosterola)	-	2873	-	
37	Sterol 3 (derivat ergosterola)	-	2956	-	

RI – eksperimentalni retencioni indeksi određeni u odnosu na alkane C<sub>8</sub> – C<sub>40</sub>; RL – literaturni retencioni indeks; a – Stojanović i saradnici (2011); b – Mitrović i saradnici (2014); c – Heinrich i saradnici (2002); d – Stojanović i saradnici (2018); e – Adams (2007); f – Zhao i saradnici (2009); g – Mitrović i saradnici (2015); \* hemijska struktura ergosterola.

Sterol 1 MS, 70 eV, m/z (rel. int.): 363 (100 %), 69 (43 %), 143 (33 %), 337 (32 %), 145 (31 %), 364 (28 %), 211 (23 %), 55 (23 %), 119 (21 %), 157 (21 %);

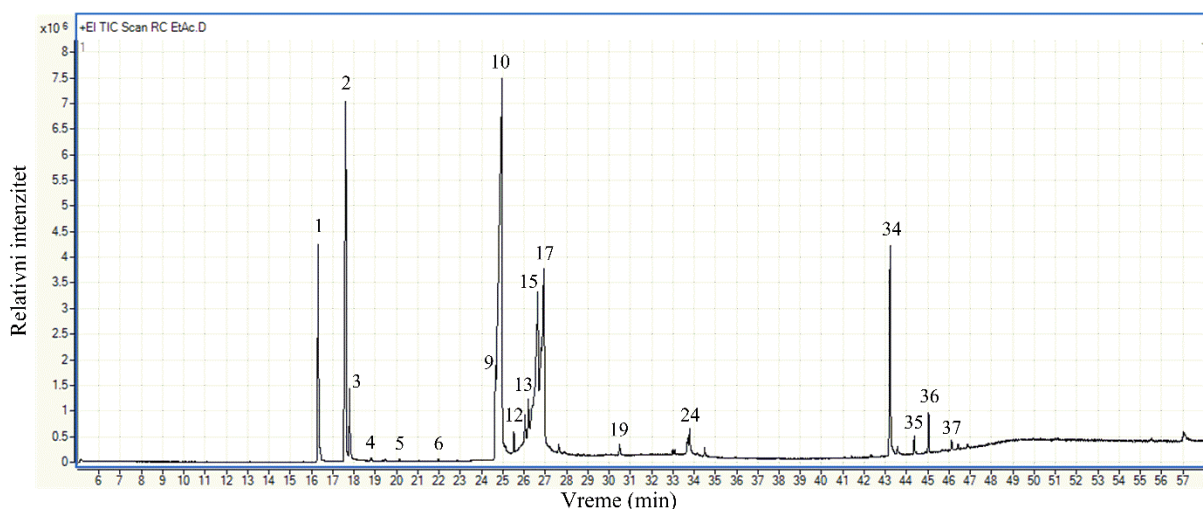
Sterol 2 MS, 70 eV, m/z (rel. int.): 253 (100 %), 199 (40 %), 254 (20 %), 69 (19 %), 378 (16 %), 157 (14 %), 159 (12 %), 145 (11 %), 238 (11 %), 55 (10 %);

Sterol 3 MS, 70 eV, m/z (rel. int.): 380 (100 %), 81 (92 %), 69 (73 %), 255 (73 %), 145 (58 %), 105 (58 %), 55 (46 %), 133 (45 %), 91 (43 %), 107 (42 %).

Analiza hemijskog sastava isparljivih komponenti pokazala je da su everninična kiselina, orcinol, orcinol-monometil-etar, 3-metilorselinska kiselina i usninska kiselina glavne lišajevske supstance prisutne u etil-acetatnom, etarskom i dihlormetanskom ekstraktu lišaja *R. capitata*. Everninična kiselina i orcinol, najzastupljeniji monoaromatični derivati, prisutni u etarskom (24,7 i 25,8 %, redom) i etil-acetatnom (33,7 i 16,7 %, redom) ekstraktu, zajedno sačinjavaju polovinu isparljivih sastojaka analiziranog ekstrakta. Manje količine everninične kiseline i orcinola (22,2 i 11,9 %, redom) zastupljene su u dihlormetanskom ekstraktu, čija je najdominantnija komponenta usninska kiselina sa udelom od 25,8 %. Ovaj dibenzofuran ulazi u sastav i etarskog i etil-acetatnog ekstrakta sa procentnim sadržajem od 4,4 % i 8,2 %, redom. Sadržaj ostalih monoaromatičnih komponenti, u etil-acetatnom, etarskom i dihlormetanskom ekstraktu, su u opsegu od 4,8 % do 11,6 % (za orcinol-monometil-etar) i 7,1 % do 10,2 % (za 3-metilorselinsku kiselinu). Za razliku od ostalih ispitivanih, acetonski ekstrakt je okarakterisan velikim sadržajem orcinola i njegovog monometil-etra (20,9 i 28,3 %, redom), dok everninična, usninska i 3-metilorselinska kiselina nisu identifikovane. Iako everninična kiselina nije sastavni deo acetonskog ekstrakta, njen derivat (sparasol) je prisutan sa udelom od 5,3 %.

Jedinjenje 2-hidroksi-4-metoksi-3,5,6-trimetilbenzoeva kiselina predstavlja značajnu komponentu etil-acetatnog ekstrakta (10,4 %), ali ne ulazi u sastav ostalih ekstrakata. U etarskom ekstraktu identifikovano je prisustvo metil-3,5,6-trimetilrezorcilata sa udelom od 9,7 %, dok je u ostalim ekstraktima ova komponenta zastupljena u malim procentima (do 1,8 %).

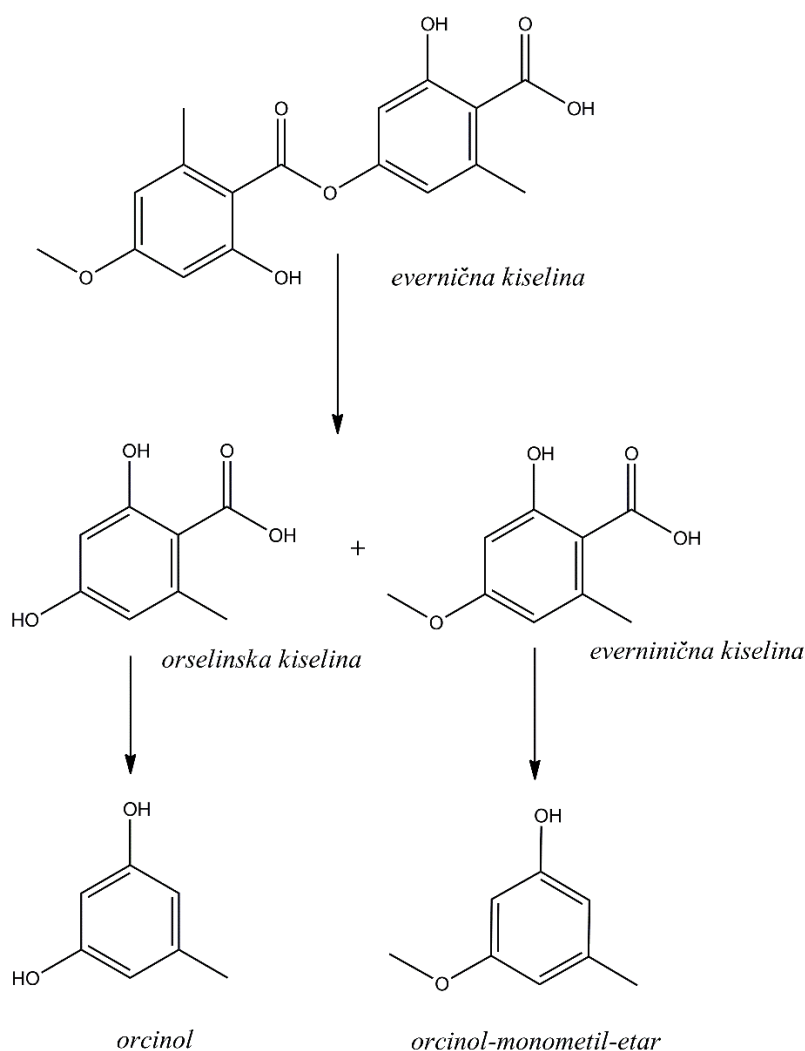
Osim orcinola i njegovih derivata kao dominantnih metabolita, etil-acetatni, etarski i dihlormetanski ekstrakt lišaja *R. capitata* takođe sadrže, u manjim količinama,  $\beta$ -orcinol (0,1 %) i njegov derivat  $\beta$ -orcinol-monometil-etar (0,4 – 3,4 %).



**Slika 15.** GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta lišaja *R. capitata*

Uobičajene masne kiseline (palmitinska, linoleinska, oleinska i stearinska kiselina) prisutne su u malim količinama u etil-acetatnom i dihlormetasnom ekstraktu, dok su metil-estri ovih masnih kiselina zastupljeni u acetonskom ekstraktu u značajnim količinama – metil-palmitat (4,7 %), metil-linoleat (15,9 %) i metil-linolenat (6,7 %). Steroli su identifikovani u etil-acetatnom, etarskom i dihlormetanskom ekstraktu (0,1 – 1,4 %).

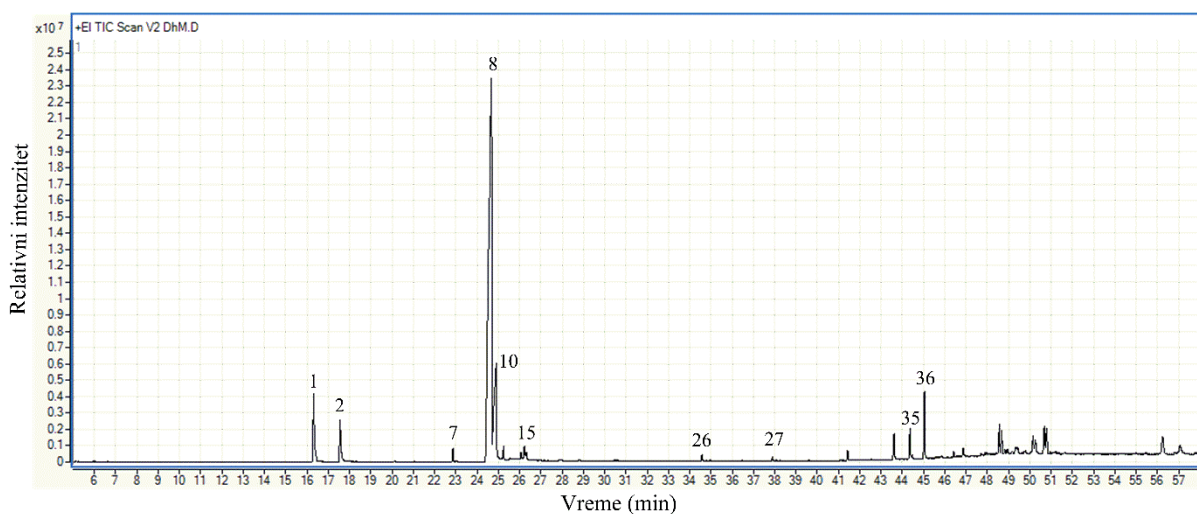
Tokom GC-MS analize, dolazi do degradacionog procesa evernične kiseline (Schulz i Albroscheit, 1989) gde u prvom koraku nastaje orselinska kiselina i everninična kiselina, a nakon dekarboksilacije, orcinol i orcinol-monometil-etar (Slika 16). Kako je everninična kiselina identifikovana i HPLC metodom, može se pretpostaviti da je ovaj metabolit sastavni deo lišaja *R. capitata* a ne degradacioni proizvod evernične kiseline, koja predstavlja glavnu komponentu svih ispitivanih ekstrakata identifikovanih HPLC analizom.



**Slika 16.** Degradacioni proces evernične kiseline tokom GC-MS analize

Prethodnim istraživanjem, everninična kiselina identifikovana je GC-MS analizom u etarskom i etil-acetatnom ekstraktu lišaja *Evernia prunastri* (Stojanović i saradnici, 2018). U lišaju *Umbilicaria crustulosa* detektovan je orcinol sa 82,1 % zastupljenosti (Zlatanović, 2019). U hemijski sastav isparljivih komponenti lišaja *Evernia prunastri* ulaze usninska kiselina (11,4 %), orcinol (25,0 %) i orcinol-monometil-etar (5,7 %), dok je u lišaju *Parmelia sulcata* dokazano prisustvo masnih kiselina i sterola GC-MS analizom (Stojanović i saradnici, 2011).

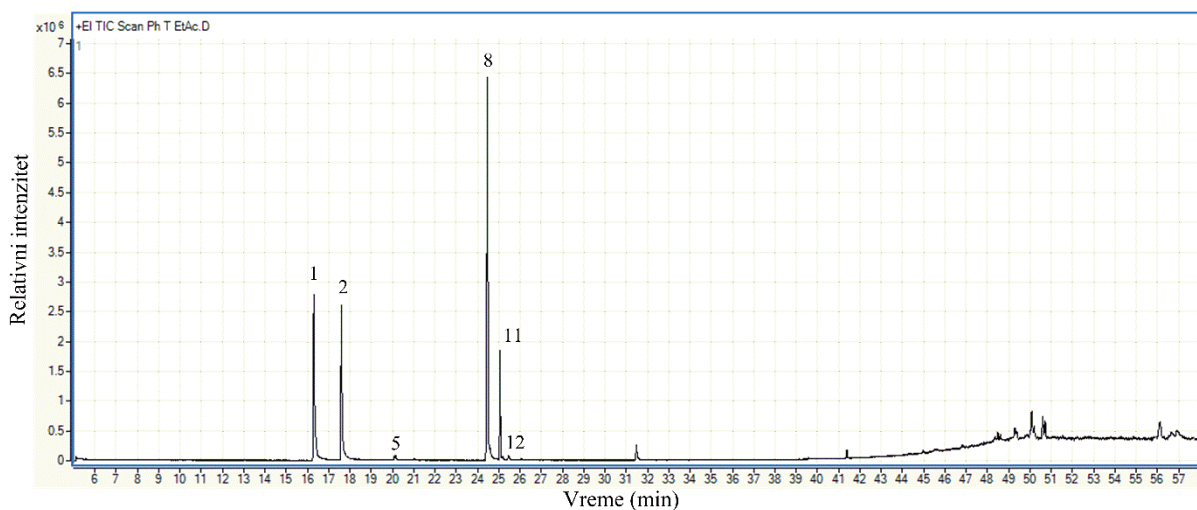
Rezultati GC-MS analize pokazuju da je hemijski sastav isparljivih komponenti ispitivanih ekstrakata lišaja *P. horizontalis* veoma sličan, sa izuzetkom dihlormetanskog ekstrakta celokupnog lišaja. Metil-orselinat je najzastupljenija komponenta svih ispitivanih ekstrakata (36,3 – 64,3 %), osim etarskih ekstrakata talusa i apotecija kod kojih je glavna komponenta dodecil-akrilat (50,6 % za talus i 45,9 % za apotecije). Značajna količina dodecil-akrilata prisutna je u acetonskom (4,3 %) i etil-acetatnom (9,0 %) ekstraktu talusa i etil-acetatnom ekstraktu apotecija (7,2 %). Dihlormetanski ekstrakt celokupnog lišaja okarakterisan je prisustvom everninične kiseline sa 14,1 % zastupljenosti, dok u ostalim ekstraktima nije prisutan, čak ni u tragovima, što ga čini različitim od svih ostalih ekstrakata.



**Slika 17.** GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*

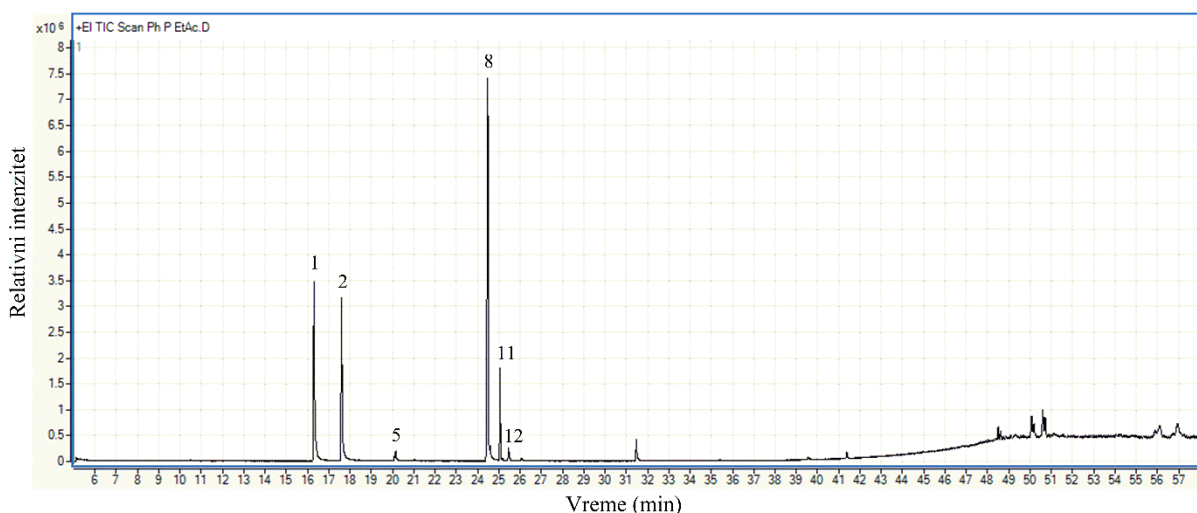
Orcinol i orcinol-monometil-etar prisutni u svim ekstraktima lišaja *P. horizontalis*, zajedno sačinjavaju i do skoro polovine od ukupne identifikovane količine, sa opsegom od 15,8 % do 26,2 % za orcinol i 7,0 do 23,5 % za orcinol-monometil-etar. Jedini izuzetak je dihlormetanski ekstrakt celokupnog lišaja gde su orcinol i orcinol-monometil-etar zastupljeni sa samo 3,1 % i 4,8 %, redom. U znatno malim procentima (ili tragovima) zastupljeni su i

sledeći metaboliti: lauril-alkohol, sparasol, atrarična kiselina, etil-orselinat i metil-2-hidroksi-4-metoksi-3,6-dimetilbenzoat.



**Slika 18.** GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*

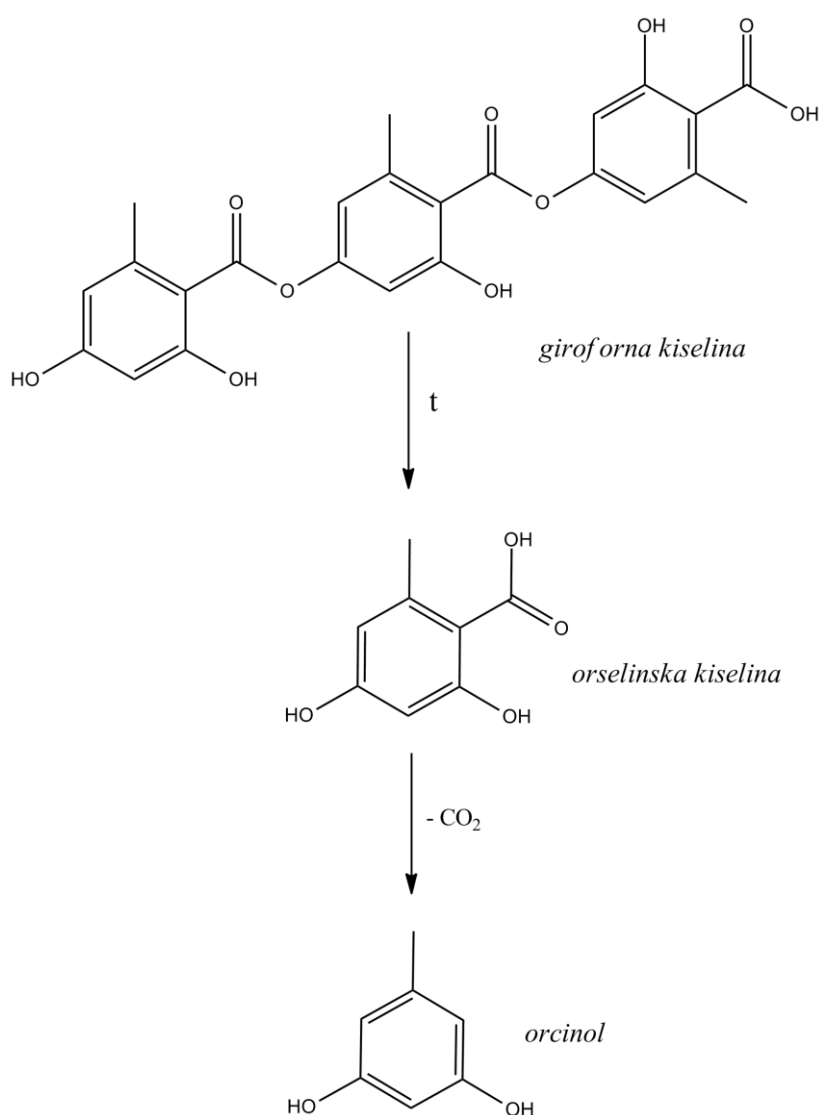
Iako prisustvo masnih kiselina nije identifikovano, butil estri palmitinske i stearinske kiseline su sastavni delovi etil-acetatnog, etarskog i dihlormetanskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis* sa udelom od 0,3 % do 4,9 % (za butil-palmitat) i 0,2 % do 2,4 % (za butil-stearat). Takođe, etarski ekstrakt celokupnog lišaja okarakterisan je prisustvom *n*-alkana (1,1 – 2,2 %). Steroli su identifikovani u svim acetonskim, etil-acetatnim i dihlormetanskim ekstraktima sa udelom do 6,7 %, s tim što su najzastupljeniji u ekstraktima celokupnog lišaja.



**Slika 19.** GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*

Steroli prisutni u lišajevima *R. capitata* i *P. horizontalis* verovatno su integralne komponente, jer su ove vrste sakupljene sa stene i zemljišta, tako da se može isključiti mogućnost prelaska jedinjenja sa drveta na lišaj (Joulain i Tabacchi, 2009<sup>b</sup>).

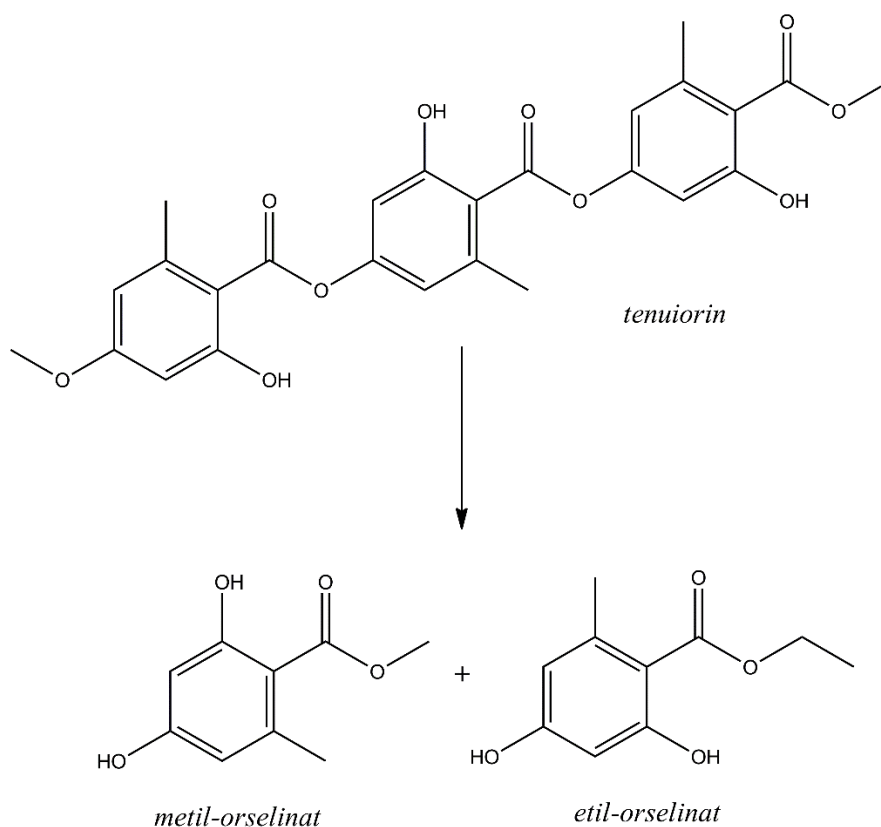
Termalnom degradacijom giroforne kiseline (Slika 20) tokom GC-MS analize, dolazi do stvaranja orselinske kiseline (Culberson, 1969), koja daljom dekarboksilacijom prelazi u orcinol. Uzimajući u obzir da je jedna od glavnih komponenata HPLC analize ekstrakata lišaja *P. horizontalis* metil-giroforat, možemo zaključiti da je glavna komponenta GC-MS analize, metil-orselinat, monoaromatični proizvod nastao u procesu termalne razgradnje metil-giroforata.



**Slika 20.** Degradacija giroforne kiseline tokom GC-MS analize



Po istom principu, od tenuiorina (Slika 21), kao najdominatnijeg metabolita ispitivanih ekstrakata apotecija i celokupnog lišaja *P. horizontalis*, nastaje metil-orselinat zajedno sa etil-orselinatom (Ingólfssdóttir i sardnici, 1985).



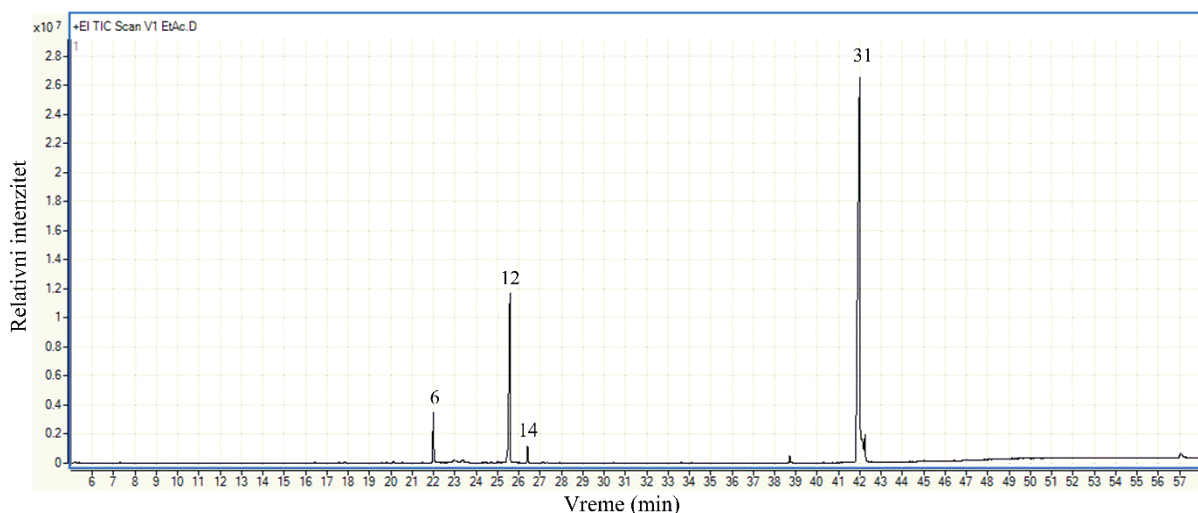
**Slika 21.** Degradacija tenuiorina tokom GC-MS analize

Metil-orselinat je prethodno identifikovan u lišaju *P. leucophlebia*, od strane Ingólfssdóttir i saradnika (2002). Ne postoje podaci o identifikaciji dodecil-akrilata u isparljivim komponentama lišajeva, međutim ulazi u sastav mnogih biljnih vrsta. Izolovan je iz etarskog ulja biljke *Gynura cusimbua* (Rana i Blazquez, 2007) i iz cveta bele ruže *Rosa rugosa* (Joo i saradnici, 2010). S obzirom da se dodecil-akrilat koristi za proizvodnju polimera, lepkova i plastike, u našim uzorcima je mogao dospeti u toku pripreme uzorka za analizu, međutim, ova komponenta je predstavljena zato što su i ostali uzorci podvrgnuti istom procesu pripreme ali u pojedinim nije identifikovana. Na osnovu dosadašnjih literaturnih istraživanja, nema podataka o ispitivanju isparljivih komponenti lišaja *P. horizontalis*, tako da je ova analiza hemijskog sastava isparljivih metabolita, korišćenjem GC-MS metode, rađena po prvi put.

Na hromatogramima ispitivanih ekstrakata lišaja *C. rangiformis* najintenzivniji pik pripada rangiformnoj kiselini, koja sačinjava 58,5 % – 73,8 % ukupnog hemijskog sastava



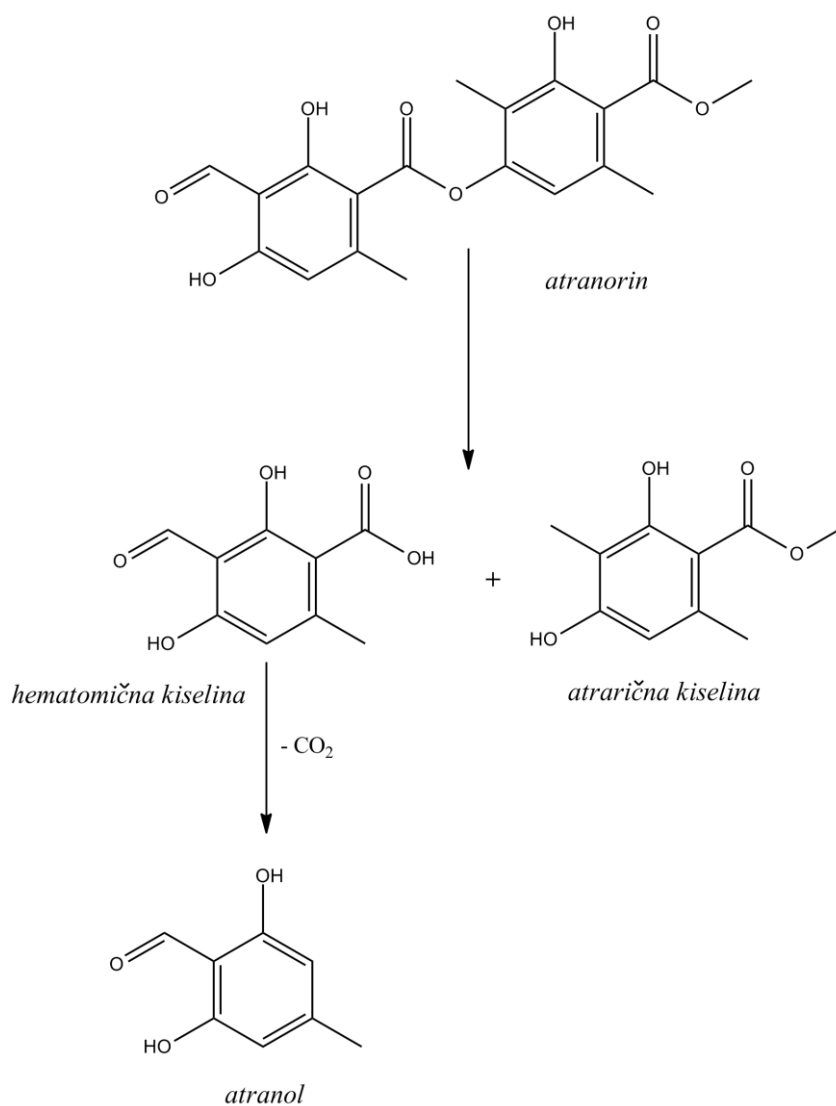
isparljivih komponenti. Atrarična kiselina je druga po zastupljenosti u svim ispitivanim ekstraktima, pri čemu je u etarskom ekstraktu ima najmanje sa 13,5 % dok je u najvećem procentu zastupljena u dihlormetanskom ekstraktu sa 29,8 %. U svim uzorcima lišaja *C. rangiformis* detektovan je atranol u značajnim količinama (4,3 – 10,6 %), praćen  $\beta$ -orcinolom i etil-hematomatom sa veoma malim procentnim sadržajem (do 2,5 % i 1,2 %, redom).



**Slika 22.** GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*

HPLC analiza je pokazala prisustvo atranorina sa više od 89,2 % zastupljenosti u ekstraktima lišaja *C. rangiformis*. Degradacijom prisutnog atranorina (tokom GC-MS analize) nastaju atrarična kiselina i hematomična kiselina čijom dekarboksilacijom nastaje atranol (Slika 23) (Stojanovic i saradnici, 2011). Uzimajući u obzir da je atrarična kiselina identifikovana i u uzorcima HPLC metodom, zaključujemo da je atranol produkt razgradnje atranorina.

Prethodna istraživanja pokazala su prisustvo rangiformne kiseline u lišaju *C. rangiformis* (Huneck i saradnici, 2004). Pino-Bodas i saradnici (2017) ispitivali su hemijski sastav isparljivih komponenti GC-MS metodom, i dokazali prisustvo masnih kiselina i njihovih estra, atraričnu kiselinu, fitol i orcinolaldehid u lišaju *C. rangiformis*, što je delimično u skladu sa našim rezultatima.



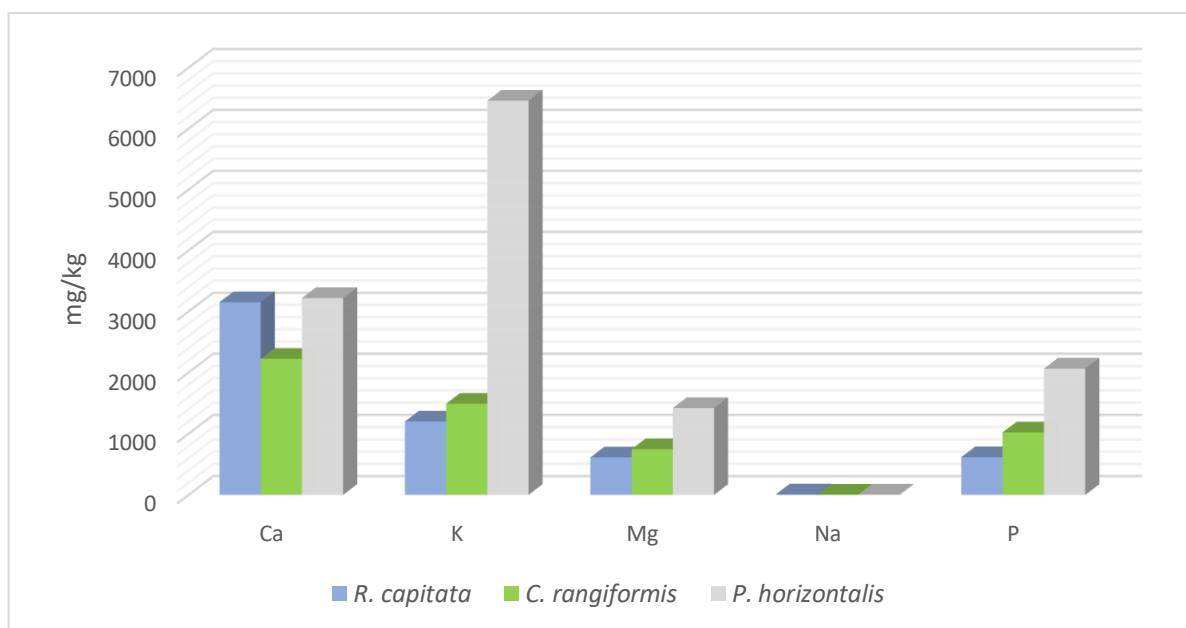
**Slika 23.** Razgradnja atranorina tokom GC-MS analize

### 3.3. ICP-OES analiza

Pomoću ICP-OES tehnike analiziran je sadržaj 5 makroelemenata (Ca, K, Mg, Na i P) i 15 mikroelemenata (Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Si, V i Zn) u odabranim vrstama lišajeva, a rezultati su dati u Tabelama 11 i 12.

**Tabela 11.** Sadržaj makroelemenata u analiziranim vrstama lišajeva. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (mg/kg) ± standardna devijacija

Element	Uzorak		
	<i>R. capitata</i>	<i>P. horizontalis</i>	<i>C. rangiformis</i>
<b>Ca</b>	3152 ± 23	3220 ± 34	2223 ± 26
<b>K</b>	1199 ± 13	6458 ± 88	1489 ± 18
<b>Mg</b>	612 ± 7	1419 ± 10	746 ± 2
<b>Na</b>	7,7 ± 0,2	4,71 ± 0,03	3,66 ± 0,03
<b>P</b>	616 ± 3	2063 ± 32	1020 ± 21



**Slika 24.** Sadržaj makroelemenata (Ca, K, Mg, Na i P) u ispitivanim vrstama lišajeva

Najzastupljeniji elementi u svim ispitivanim uzorcima su Ca i K, dok je Na prisutan u najmanjim količinama (Slika 24). Prema rezultatima, redosled sadržaja makroelemenata u odabranim vrstama lišajeva je Ca > K > P > Mg > Na, sa izuzetkom u sadržaju K, koji je u lišaju *P. horizontalis* prisutan u većoj količini od Ca, a ujedno je i element sa najvećom količinom od svih ispitivanih elemenata (6458 ± 88 mg/kg). Sadržaj K je za oko 5 puta manji u frutikoznim lišajevima *R. capitata* i *C. rangiformis*, nego u folioznom tipu lišaja *P.*

*horizontalis*. Kalcijum je u lišaju *C. rangiformis* prisutan u količini manjoj za trećinu nego u lišajevima *R. capitata* i *P. horizontalis*. Zastupljenost K, Mg i P prisutnih u lišajevima je *P. horizontalis* > *C. rangiformis* > *R. capitata*. Sadržaj makroelementa Mg i P je dva puta veći u lišaju *P. horizontalis* nego u *C. rangiformis*, dok je u lišaju *R. capitata* količina Mg i P 2,3, odnosno, 3,3 puta manja (redom) u odnosu na *P. horizontalis*. Lišaj *R. capitata* sadrži istu količinu Mg i P, i ima najveći sadržaj Na, čija se zastupljenost u lišajevima kreće se od 3,66 do 7,7 mg/kg. Možemo zaključiti da foliozni tip lišaja *P. horizontalis* ima veći sadržaj svih makroelemenata (osim Na) u odnosu na frutikozne vrste lišajeva.

**Tabela 12.** Sadržaj mikroelemenata u analiziranim vrstama lišajeva. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (mg/kg) ± standardna devijacija

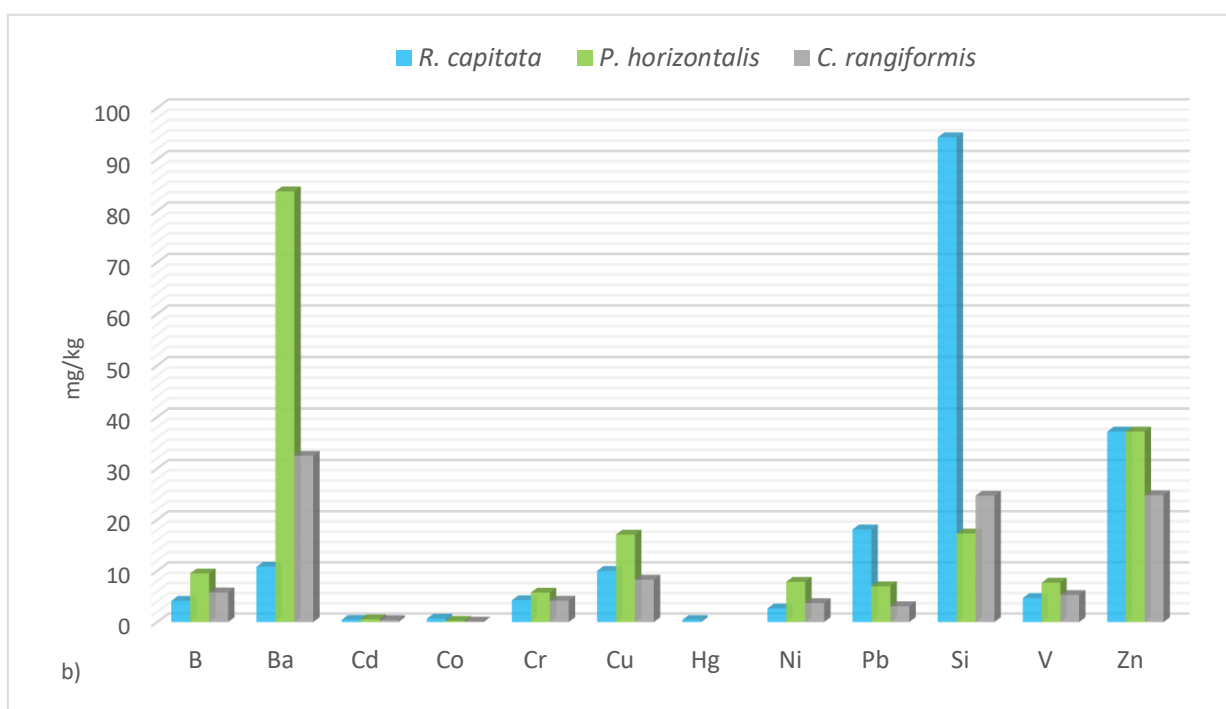
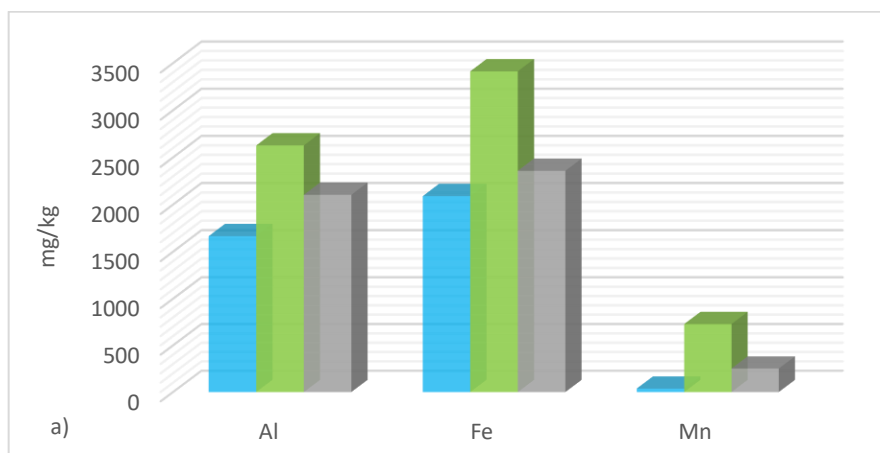
Element	Uzorak		
	<i>R. capitata</i>	<i>P. horizontalis</i>	<i>C. rangiformis</i>
<i>Al</i>	1665 ± 8	2627 ± 13	2103 ± 11
<i>B</i>	4,16 ± 0,09	9,5 ± 0,6	5,8 ± 0,1
<i>Ba</i>	10,87 ± 0,02	83,8 ± 0,8	32,5 ± 0,2
<i>Cd</i>	0,444 ± 0,001	0,56 ± 0,013	0,405 ± 0,008
<i>Co</i>	0,663 ± 0,026	0,249 ± 0,002	0,116 ± 0,001
<i>Cr</i>	4,27 ± 0,07	5,77 ± 0,09	4,18 ± 0,08
<i>Cu</i>	10,04 ± 0,02	17,1 ± 0,8	8,29 ± 0,06
<i>Fe</i>	2089 ± 8	3413 ± 35	2358 ± 11
<i>Hg</i>	0,423 ± 0,047	-	-
<i>Mn</i>	37,74 ± 0,05	729 ± 12	252 ± 2
<i>Ni</i>	2,66 ± 0,05	7,87 ± 0,08	3,71 ± 0,08
<i>Pb</i>	18,10 ± 0,07	7,02 ± 0,09	3,12 ± 0,07
<i>Si</i>	94,3 ± 0,3	17,3 ± 0,1	24,7 ± 0,2
<i>V</i>	4,70 ± 0,02	7,76 ± 0,08	5,34 ± 0,05
<i>Zn</i>	37,2 ± 0,2	37,2 ± 0,8	24,8 ± 0,2

Među analiziranim mikroelementima, Fe i Al su najzastupljeniji u ispitivanim vrstama lišajeva (Slika 25), sa količinom koja je u opsegu od 2089 do 3413 mg/kg za Fe i od 1665 do 2627 mg/kg za Al, pri čemu je prisustvo najveće u lišaju *P. horizontalis* a najmanje u *R. capitata*. Mangan je oko 20 puta manje zastupljen u *R. capitata*, odnosno 3 puta manje prisutan

u *C. rangiformis*, u odnosu na lišaj *P. horizontalis*, što ga svrstava u element sa najvećom varijacijom sadržaja u ispitivanim lišajevima. Sadržaj pojedinih elemenata je prilično uniforman: Cd (0,405 – 0,56 mg/kg) i Cr (4,18 – 5,77 mg/kg); ili se njihov sadržaj u lišajevima razlikuje za oko dva ili manje od dva puta: B (4,16 – 9,5 mg/kg), Cu (8,29 – 17,1 mg/kg), Ni (2,66 – 7,87 mg/kg), V (4,7 – 7,76 mg/kg) i Zn (24,8 – 37,2 mg/kg). Foliozni tip lišaja *P. horizontalis* ima najveći sadržaj mikroelemenata, izuzev Co, Pb i Si, čiji je sadržaj najveći u lišaju *R. capitata*, dok je njihova zastupljenost u drugim lišajevima znatno manja (i do 6 puta). Prisustvo najvećeg sadržaja Si u *R. capitata* je očekivano, s obzirom da je lišaj prikupljen sa silikatne stene. Živa je detektovana samo u lišaju *R. capitata* (0,42 mg/kg), što se potencijalno može objasniti činjenicom da je ova vrsta lišaja sakupljena sa lokaliteta (Stara planina) koji je drugačiji u odnosu na ostale vrste (Suva planina). Mikroelementi As, Se, Be i Tl nisu detektovani ni u jednoj ispitivanoj vrsti lišaja.

Akumulacija metala iz atmosfere zavisi od morfologije lišaja: što je veća njegova površina talusa veća je i sposobnost akumulacije (Aslan i saradnici, 2004). S obzirom da je *P. horizontalis* jedini foliozni tip od ispitivanih vrsta lišajeva, očekuje se i prisustvo najvećeg sadržaja metala. Ne postoji pravilnost u zastupljenosti makro i mikroelemenata u uzorcima frutikoznih lišajeva koji rastu na steni (*R. capitata*) ili zemljištu (*C. rangiformis*).

Aslan i saradnici (2004) ispitivali su sadržaj K, Ca, Ti, Fe, Sr i Ba u lišaju *R. capitata* koji raste u Turskoj. Rezultati su pokazali da je zastupljenost elemenata u ispitivanom lišaju  $K > Ca > Fe > Ti$ , dok Sr i Ba nisu detektovani, što nije u saglasnosti sa našim rezultatima.



**Slika 25** (a, b). Sadržaj mikroelemenata (Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Si, V i Zn) u ispitivanim vrstama lišajeva

### 3.4. Antioksidativna aktivnost

Određivanje antioksidativne aktivnosti acetonskih ekstrakata lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis* vršeno je sledećim metodama: DPPH metoda, ABTS metoda, određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC), CUPRAC metoda i metoda određivanja ukupne redukcione moći (TRP). Rezultati su predstavljeni u Tabelama 13 i 14.

Prema DPPH metodi, čiji su rezultati izraženi kao procenat inhibicije DPPH radikala i kao IC<sub>50</sub> vrednost (koncentracija ekstrakta potrebna da smanji koncentraciju DPPH radikala za 50 %), najbolju aktivnost pokazali su acetonski ekstrakti talusa i apotecija lišaja *P. horizontalis*,

kao i ekstrakt lišaja *C. rangiformis*, smanjujući aktivnost DPPH radikala za 52,2; 56,3 i 46,3 %, dok IC<sub>50</sub> vrednosti ovih ekstrakata iznose 14,4; 13,3 i 16,2 mg/ml, redom. Nešto slabiju aktivnost prema DPPH radikalu pokazao je acetonski ekstrakt lišaja *R. capitata* sa IC<sub>50</sub> od 35,3 mg/ml i sposobnošću inhibicije od 21,3 %. Acetonski ekstrakt celokupnog lišaja *P. horizontalis* pokazuje najmanju aktivnost prema ovoj metodi određivanja antioksidativne aktivnosti (IC<sub>50</sub>–110,1 mg/ml; 6,8 % inhibicije DPPH radikala).

**Tabela 13.** Antioksidativna svojstva (DPPH i ABTS) acetonskih ekstrakata odabranih vrsta lišajeva. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija

Uzorak	Metoda			
	DPPH		ABTS	
	% inhibicije	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	% inhibicije	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
<b>RC</b>	21,3 ± 0,9	35,3 ± 0,7	36,1 ± 0,7	20,8 ± 0,5
<b>PHT</b>	52,2 ± 1,0	14,4 ± 0,3	62,5 ± 0,8	12,0 ± 0,2
<b>PHA</b>	56,3 ± 1,0	13,3 ± 0,1	81,1 ± 1,3	9,2 ± 0,5
<b>PH</b>	6,8 ± 0,2	110,1 ± 2,3	55,7 ± 1,0	13,5 ± 0,2
<b>CR</b>	46,3 ± 0,8	16,2 ± 0,2	63,6 ± 0,9	11,8 ± 0,1

Acetonski ekstrakti (u koncentraciji od 15 mg/ml): RC – *R. capitata*, PHT – *P. horizontalis* talus, PHA – *P. horizontalis* apotecije, PH – *P. horizontalis*, CR – *C. rangiformis*.

Sisodia i saradnici (2013) pokazali su da acetonski ekstrakt lišaja *R. roesleri* poseduje sposobnost neutralizacije DPPH radikala sa udelom od 87,9 % pri koncentraciji od 250 µg/ml. Atranorin i usninska kiselina izalovane iz lišaja *R. roesleri* takođe su pokazale efekat inhibicije DPPH radikala sa IC<sub>50</sub> vrednošću od 3,97 i 0,39 mg/ml (redom).

**Tabela 14.** Antioksidativna svojstva (TRP, TPC i CUPRAC) acetonskih ekstrakata odabranih vrsta lišajeva. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija

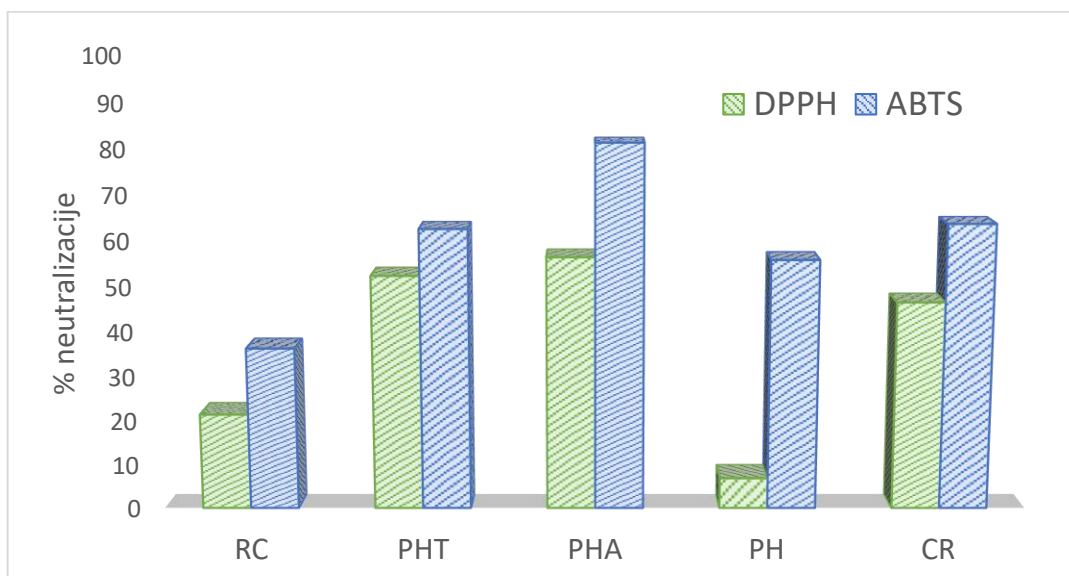
Uzorak	Metoda		
	TRP ( $\mu\text{g AAE/mg SE}$ )	TPC ( $\mu\text{g GAE/mg SE}$ )	CUPRAC ( $\mu\text{g TE/mg SE}$ )
<b>RC</b>	0,46 $\pm$ 0,10	670,63 $\pm$ 66,55	6,11 $\pm$ 0,29
<b>PHT</b>	0,24 $\pm$ 0,03	163,90 $\pm$ 10,74	12,27 $\pm$ 0,48
<b>PHA</b>	0,34 $\pm$ 0,10	247,89 $\pm$ 10,74	16,46 $\pm$ 0,30
<b>PH</b>	0,18 $\pm$ 0,07	96,28 $\pm$ 6,28	9,94 $\pm$ 0,01
<b>CR</b>	0,44 $\pm$ 0,03	132,71 $\pm$ 2,44	17,81 $\pm$ 0,28

Acetonski ekstrakti: RC – *R. capitata*, PHT – *P. horizontalis* talus, PHA – *P. horizontalis* apotecije, PH – *P. horizontalis*, CR – *C. rangiformis*; TRP – ukupna redukciona moć; TPC – sadržaj ukupnih fenola; CUPRAC – antioksidativna sposobnost redukcije Cu (II) do Cu (I); AAE – ekvivalent askorbinske kiseline; GAE – ekvivalent galne kiseline; TE – Troloks ekvivalent; SE – suvi ekstrakt.

Razlika u procentima inhibicije DPPH i ABTS radikala ispitivanih ekstrakata nije značajna (Slika 26), osim za acetonski ekstrakt *P. horizontalis* čija je sposobnost neutralizacije ABTS radikala veća (55,7 % inhibicije;  $IC_{50}$  – 13,5 mg/ml) u odnosu na DPPH radikal. Kao i u slučaju DPPH radikala, bolju sposobnost neutralizacije ABTS radikala poseduju uzorci istog lokaliteta – acetonski ekstrakti talusa i apotecija lišaja *P. horizontalis* sa udelom od 62,5 % i 81,1 % ( $IC_{50}$  – 12,0 i 9,2 mg/ml, redom) i ekstrakt lišaja *C. rangiformis* sa udelom od 63,6 % ( $IC_{50}$  – 11,8 mg/ml), nego acetonski ekstrakt lišaja *R. capitata* sa 36,1 % ( $IC_{50}$  – 20,8 mg/ml).

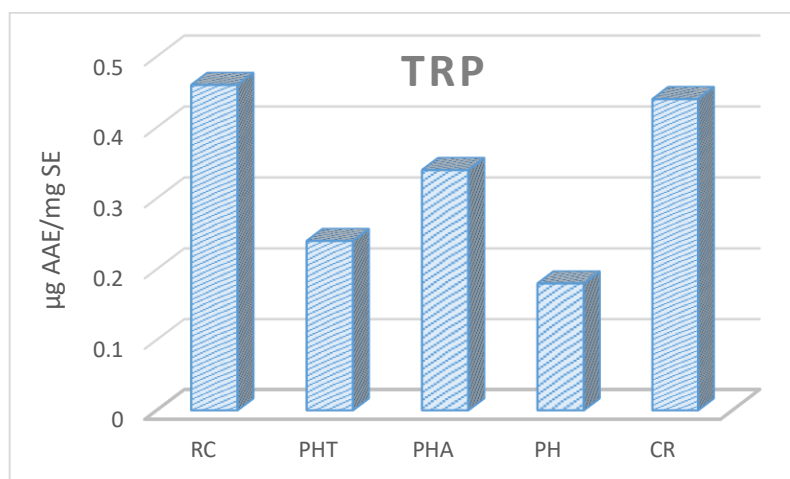
Paudel i saradnici (2012) pokazali su sposobnost redukcije DPPH i ABTS radikala (izražena kao  $IC_{50}$ ) metanolnih ekstrakata vrsta lišajeva iz roda *Ramalina* (32,9 i 52,0  $\mu\text{g/ml}$ , redom), *Peltigera* (5,6 i 6,9  $\mu\text{g/ml}$ , redom) i *Cladonia* (38,5 i 51,6  $\mu\text{g/ml}$ , redom).





**Slika 26.** Sposobnost neutralizacije DPPH i ABTS radikala acetonskim ekstraktima (koncentracije 15 mg/ml) lišajeva *R. capitata* (RC), *P. horizontalis* (PH) i *C. rangiformis* (CR) i acetonskim ekstraktima talusa (PHT) i apotecija (PHA) lišaja *P. horizontalis*

Vrednosti ukupne redukcionne moći acetonskih ekstrakata lišajeva, koja je izražena preko ekvivalenta askorbinske kiseline, su približno iste za sve ekstrakte, pri čemu najveću vrednost pokazuje ekstrakt lišaja *R. capitata* (0,46  $\mu\text{g AAE/mg SE}$ ), dok najmanju vrednost ukupne redukcionne moći ima ekstrakt lišaja *P. horizontalis* (0,18  $\mu\text{g AAE/mg SE}$ ) (Slika 27).

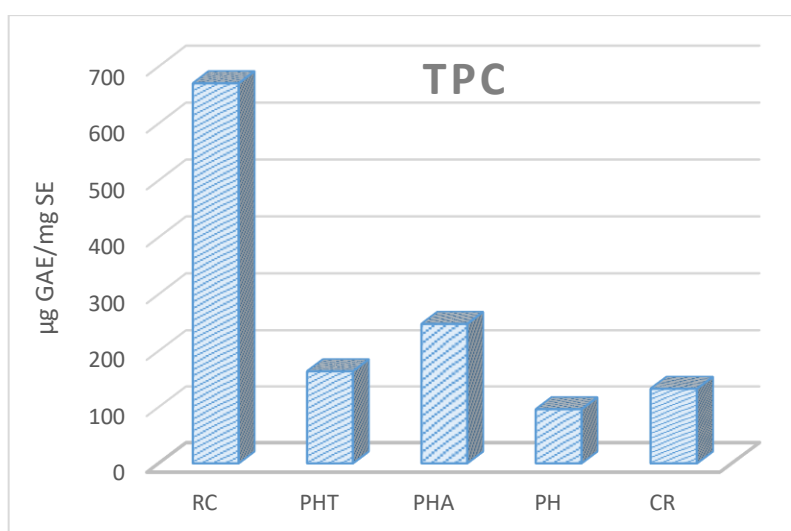


**Slika 27.** Ukupna redukcionna moć acetonskih ekstrakata lišajeva *R. capitata* (RC), *P. horizontalis* (PH) i *C. rangiformis* (CR), i acetonskih ekstrakata talusa (PHT) i apotecija (PHA) lišaja *P. horizontalis*.

(AAE – ekvivalent askorbinske kiseline; SE – suvi ekstrakt)

Najveći sadržaj ukupnih fenola (Slika 28), izražen preko ekvivalenta galne kiseline, pokazao je acetonski ekstrakt lišaja *R. capitata* (670,63  $\mu\text{g}$  GAE/mg SE). Dva do tri puta manji sadržaj ukupnih fenola imali su ekstrakti apotecija i talusa lišaja *P. horizontalis* (247,89 i 163,90  $\mu\text{g}$  GAE/mg SE, redom) i ekstrakt lišaja *C. rangiformis* (132,71  $\mu\text{g}$  GAE/mg SE). U acetonskom ekstraktu celokupnog lišaja *P. horizontalis* pronađen je najmanji ukupni sadržaj fenola (96,28  $\mu\text{g}$  GAE/mg SE). Na osnovu rezultata, može se utvrditi da ne postoji potpuna korelacija fenolnog sadržaja ekstrakta lišaja *R. capitata* i sposobnosti neutralisanja DPPH i ABTS radikala, dok se kod ostalih ekstrakata fenolni sadržaj i ispoljena antiradikalska aktivnost mogu uporediti.

Prethodna ispitivanja pokazala su da hloroformski ekstrakt lišaja *C. rangiformis* ima sadržaj ukupnih fenola od 0,048  $\mu\text{g}$  GAE/mg SE (Yücel i saradnici, 2007).

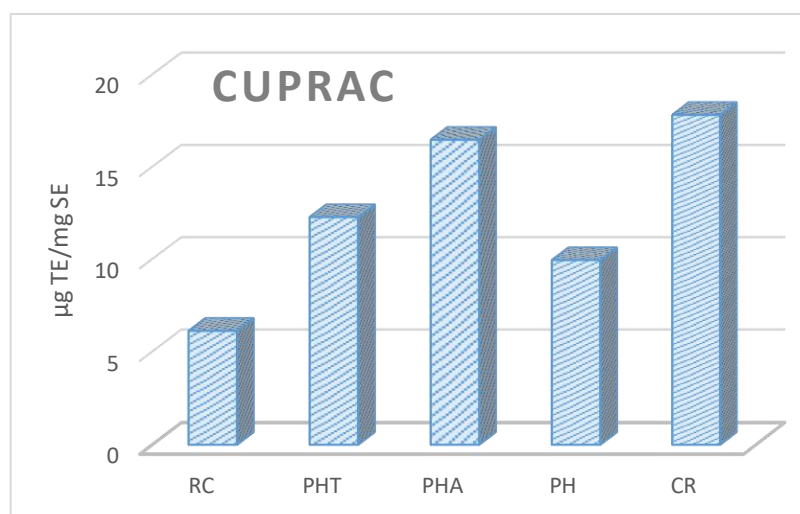


**Slika 28.** Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja acetonskih ekstrakata lišajeva *R. capitata* (RC), *P. horizontalis* (PH) i *C. rangiformis* (CR), i acetonskih ekstrakata talusa (PHT) i apotecija (PHA) lišaja *P. horizontalis*.

(GAE – ekvivalent galne kiseline; SE – suvi ekstrakt)

Prema CUPRAC metodi, najbolju antioksidativnu sposobnost redukcije Cu (II) do Cu (I), izraženu preko ekvivalenta Troloksa, pokazao je acetonski ekstrakt lišaja *C. rangiformis* sa vrednošću od 17,81  $\mu\text{g}$  TE/mg SE. Nešto slabiju aktivnost pokazali su talus i apotecije lišaja *P. horizontalis* (12,27 i 16,46  $\mu\text{g}$  TE/mg SE, redom), kao i ekstrakt celokupnog lišaja *P. horizontalis* (9,94  $\mu\text{g}$  TE/mg SE), dok najslabiju sposobnost redukcije ima acetonski ekstrakt lišaja *R. capitata* sa vrednošću od 6,11  $\mu\text{g}$  TE/mg SE (Slika 29). Zlatanović i saradnici (2017)

pokazali su da aktivnost acetonskog ekstrakta lišaja *Umbilicaria crustulosa*, korišćenjem CUPRAC analize, iznosi 19,76 mg TE/mg SE.



**Slika 29.** Antioksidativna sposobnost redukcije Cu (II) do Cu (I) acetonskih ekstrakata lišajeva *R. capitata* (RC), *P. horizontalis* (PH) i *C. rangiformis* (CR), i acetonskih ekstrakata talusa (PHT) i apotecija (PHA) lišaja *P. horizontalis*.  
(TE – ekvivalent Troloksa; SE – suvi ekstrakt)

Na osnovu rezultata antioksidativne aktivnosti, acetonski ekstrakt celokupnog lišaja *P. horizontalis* ima slabiji antioksidativni efekat nego pojedinačni delovi, tako da je antagonistički efekat komponenti prisutnih u talusu i apotecijama značajan. Acetonski ekstrakt apotecija pokazuje jaču antioksidativnu sposobnost od ekstrakta talusa, što se potencijalno može pripisati prisustvu tridepsida tenuiorina (peltigerina) koji predstavlja glavnu komponentu apotecija, dok u talusu nije identifikovan.

### 3.5. Antimikrobna analiza

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti acetonskih ekstrakata odabranih vrsta lišajeva izvršeno je na tri Gram-negativne (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella abony* NCTC 6017 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) i dve Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* ATCC 6633). Rezultati ispitivanja dati su u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Baktericidna aktivnost acetonskih ekstrakata lišajeva (1 mg po disku) i antibiotika, hloramfenikola (30 µg po disku) i streptomicina (10 µg po disku), na dve Gram-pozitivne i tri Gram-negativne bakterije

Uzorci	Dijametar baktericidne zone (mm)				
	<i>E. coli</i> (G-)	<i>S. abony</i> (G-)	<i>P. aeruginosa</i> (G-)	<i>S. aureus</i> (G+)	<i>B. subtilis ssp.</i> <i>spizizenii</i> (G+)
<i>R. capitata</i>	-	-	-	19 ± 0,3	28 ± 0,5
<i>P. horizontalis</i>	-	-	-	-	-
<i>P. horizontalis</i> (talus)	-	-	-	-	-
<i>P. horizontalis</i> (apotecije)	-	-	-	-	-
<i>C. rangiformis</i>	-	-	-	14 ± 0,1	-
Hloramfenikol	22 ± 0,3	28 ± 0,3	17 ± 0,1	29 ± 0,3	32 ± 0,5
Streptomicin	13 ± 0,1	16 ± 0,2	18 ± 0,1	20 ± 0,2	22 ± 0,2
Aceton	-	-	-	-	-

Aktivnost je izražena u mm prečnika zone inhibicije, uključujući prečnik diska od 12 mm za ekstrakte i aceton, i 6 mm za antibiotike. G- Gram-negativne bakterije; G+ Gram-pozitivne bakterije. Crtica (-) označava da uzorak nema aktivnost. Rezultati su dati kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

Najveću antimikrobnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija imao je ekstrakt lišaja *R. capitata* sa zonom inhibicije od 28 ± 0,5 mm za bakteriju *B. subtilis ssp. spizizenii*, dok se nešto slabiji antimikrobni efekat pokazao kod bakterije *S. aureus* sa zonom inhibicije od 19 ± 0,3 mm. Ostale Gram-negativne bakterije bile su rezistentne na dejstvo acetonskog ekstrakta *R. capitata*. Dobijeni rezultati nisu bili potpuno u saglasnosti sa prethodno objavljenim istraživanjima. Naime, Cansaran i saradnici (2007) dokazali su da acetonski ekstrakt lišaja *R. capitata* (koncentracije 0,25 mg po disku dijametra 6 mm) ne poseduje antibakterijsku aktivnost protiv *P. aeruginosa* i *S. aureus*, dok protiv bakterija soja *E. coli*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* i *Bacillus megaterium* pokazuje umerenu antibakterijsku aktivnost. Houshyar i saradnici (2014), ispitivali su antimikrobnu aktivnost acetonskog, metanolnog i hloroformskog ekstrakta lišaja *R. capitata*. Ispitivanja su pokazala da navedeni ekstrakti imaju dobru antimikrobnu aktivnost protiv gljivice *Fusarium equiseti* i bakterije *Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora*.

Acetonski ekstrakt lišaja *C. rangiformis* poseduje antimikrobnu aktivnost protiv bakterije soja *S. aureus*, sa zonom inhibicije od 14 ± 0,1 mm. Ekstrakt nije pokazao aktivnost na Gram-negativne bakterije u koncentraciji od 1 mg po disku. Rezultati ispitivanja Brakni i

Ali Ahmed (2018) pokazuju da je bakterija *S. aureus* veoma senzitivna na dejstvo hloroformskog, acetonskog, metanolnog i vodenog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*, i da acetonski i hloroformski ekstrakti ne ispoljavaju antimikrobnu aktivnosti protiv *E. coli*, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Međutim, dobijeni rezultati nisu u potpunosti u skladu sa rezultatima objavljenim od strane Açıkgöz i saradnika (2013) i Yücel i saradnika (2007). Naime, Açıkgöz i saradnici (2013) utvrdili su da hloroformski ekstrakt lišaja *C. rangiformis* poseduje umerenu antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. coli* (u koncentraciji 30 µg po disku), dok metanolni ekstrakt (koncentracije 332 µg po disku) nije imao antibakterijski efekat. Sa druge strane, oba ekstrakta pokazala su umereni antifungalni efekat na *C. albicans*. Takođe, Yücel i saradnici (2007) dokazali su slabu antimikrobnu aktivnost metanolnog, hloroformskog i vodenog ekstrakta (koncentracije 300 µg po disku) protiv Gram-pozitivne bakterije *B. subtilis* i *Bacillus amyloliquefaciens*, dok je samo metanolni ekstrakt pokazao aktivnost protiv Gram-negativne bakterije *Proteus vulgaris*.

Acetonski ekstrakti frutikoznih lišajeva pokazali su antibakterijski efekat, dok acetonski ekstrakt folioznog tipa lišaja (*P. horizontalis*) ne poseduje antimikrobnu aktivnost protiv ispitivanih bakterija. Na osnovu dostupne literature, ne postoje prethodno objavljeni podaci o antimikrobnoj aktivnosti lišaja *P. horizontalis*.

Antibakterijska aktivnost acetonskih ekstrakata lišajeva upoređena je sa aktivnošću antibiotika (streptomicina i hloramfenikola) kao pozitivne kontrole. Kao što je prikazano u Tabeli 15, antibiotici imaju jaču aktivnost u koncentraciji koja je znatno manja (30 µg hloramfenikola i 10 µg streptomicina po disku dijametra 6 mm) nego koncentracija ispitivanih ekstrakata odabranih lišajeva. Kao negativna kontrola, korišćen je rastvarač aceton, koji nije pokazao antibakterijsku aktivnost na ispitivane bakterije.

Prethodna istraživanja opisuju antimikrobnu aktivnost izolovanih jedinjenja čije je prisustvo dokazano u lišajevima *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis*. Na primer, dokazano je da efekat inhibicije rasta kod bakterija soja *B. subtilis* i *S. aureus* imaju usninska kiselina, atranorin, fumaroprotocetrarična kiselina (Yılmaz i saradnici, 2004) i giroforna kiselina (Candan i saradnici, 2006; Kosanić i saradnici, 2014<sup>b</sup>). Usninska kiselina izolovana zajedno sa protocetraričnom kiselinom pokazala je baktericidni efekat na Gram-negativnu bakteriju *E. coli* (Manojlović i saradnici, 2012<sup>b</sup>). *E. coli* je bila senzitivna i na dejstvo atranorina i fumaroprotocetrarične kiseline izolovanih iz lišaja roda *Cladonia* (Kosanić i saradnici, 2014<sup>a</sup>). Benn i saradnici (1998) utvrdili su slabu antimikrobnu aktivnost rangiformne kiseline na soj bakterije *B. subtilis*.

### 3.6. Mikronukleusni test

Primenom metode blokade citohalazinom B, ispitan je uticaj acetonskih ekstrakata lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis* na *in vitro* zaštitni efekat aberacije hromozoma u limfocitima perifernih ćelija. Za izvođenje mikronukleusnog testa korišćene su koncentracije ekstrakata od 1,0, 2,0 i 3,0 µg/ml. Izračunata je frekvencija i distribucija mikronukleusa, a rezultati su prezentovani u Tabeli 16.

**Tabela 16.** Učestalost mikronukleusa, indeks proliferacije blok citokineze, raspodela i učestalost mikronukleusa po ćelijama tretiranih različitim koncentracijama acetonskih ekstrakata odabranih vrsta lišajeva

Uzorak (koncentracija µg/ml)	MN/1000 Bn ćelija	Bn ćelije sa MN (%)	MN/Bn ćelija	CBPI	Frekvencija MN (%)
<b>Kontrola</b>	26,3 ± 0,55	2,17 ± 0,07	1,22 ± 0,04	1,64 ± 0,03	100,0
<b>Amifostin (1,0)</b>	23,3 ± 0,44 a*	1,91 ± 0,07	1,22 ± 0,07	1,61 ± 0,04	88,6
<b>MMC (0,1)</b>	33,4 ± 1,82 a;b*	2,99 ± 0,17	1,15 ± 0,04	1,71 ± 0,07	127,0
<b>RC (1,0)</b>	24,11 ± 0,67	1,83 ± 0,14	1,34 ± 0,13	1,69 ± 0,06	93,34
<b>RC (2,0)</b>	22,01 ± 1,19 a*	1,69 ± 0,16	1,32 ± 0,11	1,63 ± 0,01	85,21
<b>RC (3,0)</b>	24,74 ± 0,58	1,87 ± 0,12	1,34 ± 0,08	1,64 ± 0,02	95,78
<b>PH (1,0)</b>	24,2 ± 1,21 c*	2,06 ± 0,12	1,18 ± 0,04	1,64 ± 0,02	92,0
<b>PH (2,0)</b>	23,8 ± 0,62 a;c*	1,96 ± 0,07	1,21 ± 0,02	1,75 ± 0,05	90,5
<b>PH (3,0)</b>	25,4 ± 0,42 b;c*	1,99 ± 0,09	1,29 ± 0,05	1,65 ± 0,03	96,6
<b>PHT (1,0)</b>	21,7 ± 1,05 a*;c*	1,90 ± 0,09	1,14 ± 0,04	1,64 ± 0,07	82,5
<b>PHT (2,0)</b>	20,4 ± 1,59 a*;c*	1,65 ± 0,09	1,24 ± 0,06	1,65 ± 0,01	77,6
<b>PHT (3,0)</b>	22,3 ± 0,62 a*;c*	1,74 ± 0,13	1,30 ± 0,11	1,64 ± 0,01	84,8
<b>PHA (1,0)</b>	25,8 ± 0,69 b;c*	2,11 ± 0,11	1,23 ± 0,04	1,64 ± 0,03	98,1
<b>PHA (2,0)</b>	24,8 ± 0,85 c*	1,99 ± 0,16	1,21 ± 0,03	1,64 ± 0,02	94,3
<b>PHA (3,0)</b>	27,1 ± 1,05 b;c	2,30 ± 0,17	1,19 ± 0,06	1,67 ± 0,03	103,0
<b>CR (1,0)</b>	23,1 ± 0,82 a*;c*	1,97 ± 0,07	1,17 ± 0,03	1,61 ± 0,04	87,8
<b>CR (2,0)</b>	22,3 ± 0,51 a*;c*	1,81 ± 0,09	1,23 ± 0,05	1,66 ± 0,01	84,8
<b>CR (3,0)</b>	24,1 ± 1,31 c*	2,02 ± 0,07	1,19 ± 0,03	1,62 ± 0,05	91,6

Acetonski ekstrakti lišajeva: *R. capitata* (RC), *P. horizontalis* (PH), *P. horizontalis* talus (PHT), *P. horizontalis* apotecije (PHA), *C. rangiformis* (CR), mitomicin C (MMC);

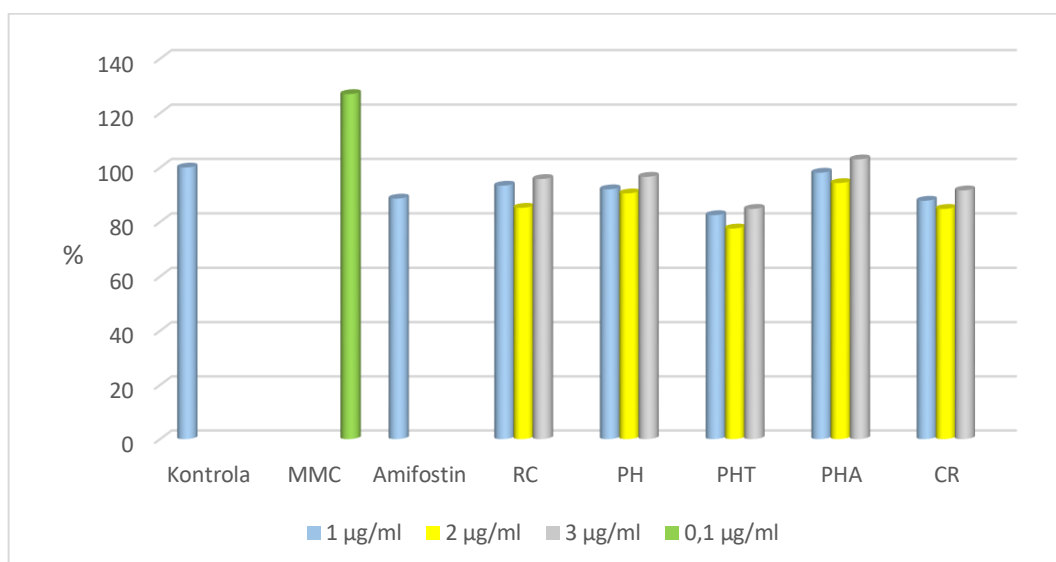
MN/1000 Bn ćelija – broj mikronukleusa na 1000 pregledanih binuklearnih ćelija, (srednja vrednost ± SD);

Bn ćelije – binuklearne ćelije sa mikronukleusom, (srednja vrednost  $\pm$  SD);  
MN/Bn ćelija – broj mikronukleusa/binuklearna ćelija, (srednja vrednost  $\pm$  SD);  
CBPI – citokinezis blok proliferacioni indeks, (srednja vrednost  $\pm$  SD);  
Frekvencija MN – učestalost mikronukleusa predstavljena kao % u odnosu na kontrolne grupe u kulturi humanih limfocita tretiranih različitom koncentracijom ekstrakata;  
Statistički značajna razlika između parova podataka procenjena je analizom varijance (One-way ANOVA) praćena korišćenjem Tukey testa. Statistička razlika je smatrana značajnom pri  $p < 0,01$  i  $p < 0,05$ .  
a – statistički značajna razlika  $p < 0,01$  u odnosu na kontrolnu grupu;  
a\* – statistički značajna razlika  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu grupu;  
b – statistički značajna razlika  $p < 0,01$  u odnosu na amifostin;  
b\* – statistički značajna razlika  $p < 0,05$  u odnosu na amifostin;  
c – statistički značajna razlika  $p < 0,01$  u odnosu na mitomicin C;  
c\* – statistički značajna razlika  $p < 0,05$  u odnosu na mitomicin C.

CBPI (citokinezis blok proliferativni indeks) se koristi za određivanje efekta testiranih ekstrakata na ćelijsku proliferaciju. Upoređivanjem CPBI vrednosti kontrolnih ćelija, amifostina i ekstrakta, dokazali smo da postoji inhibitorni efekat na proliferaciju limfocita.

Tretman alkilirajućim sredstvom MMC, kao negativnom kontrolom, u koncentraciji od 0,1  $\mu\text{g/ml}$  dao je značajan ( $p < 0,05$ ) porast frekvencije MN od 27,0 % u poređenju sa kontrolnim ćelijskim kulturama. Kulture ćelija tretirane amifostinom VR-2721, kao pozitivnom kontrolom, u koncentraciji od 1  $\mu\text{g/ml}$  dale su značajno smanjenje ( $p < 0,01$ ) frekvencije MN od 11,4 % u poređenju sa kulturama kontrolnih ćelija. Analizirani acetonski ekstrakti lišajeva u ispitanim koncentracijama izazvali su statistički značajno smanjenje broja dvojedrnih limfocita sa MN. Najveću aktivnost pokazali su ekstrakti u koncentraciji od 2,0  $\mu\text{g/ml}$  (Slika 30).

Acetonski ekstrakt *R. capitata* (RC) ima najveću aktivnost sa koncentracijom od 2,0  $\mu\text{g/ml}$  koja značajno smanjuje učestalost MN za 14,8 %, što predstavlja veći efekat nego sa amifostinom. Ekstrakti u koncentraciji od 1,0 i 3,0  $\mu\text{g/ml}$  izazivaju smanjenje frekvencije MN za 6,7 i 4,2 %, redom. Prethodna ispitivanja od strane Geyikoglu i saradnika (2007) pokazala su antigenotoksični efekat vodenog ekstrakta lišaja *R. capitata*. Ispitivanja su pokazala da je formiranje MN značajno smanjeno u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 5-10  $\mu\text{g/ml}$ . Takođe, ovim ispitivanjem ustanovljeno je da se povećanjem koncentracije povećava zaštitni efekat, bez bilo kakvih genetskih oštećenje limfocita.



**Slika 30.** Uticaj acetonskih ekstrakata lišajeva *R. capitata* (RC), *P. horizontalis* (PH) i *C. rangiformis* (CR), i acetonskih ekstrakata talusa (PHT) i apotecija (PHA) lišaja *P. horizontalis* na učestalost mikronukleusa (izraženo u %)

Acetonski ekstrakt talusa *P. horizontalis* (PHT) u koncentraciji od 2,0 µg/ml dao je smanjenje frekvencije MN za 22,4 %, što je dvostruko veće smanjenje od smanjenja izazvanog amifostinom (11,4 %). Ostali ekstrakti talusa, u koncentraciji od 1,0 i 3,0 µg/ml, prouzrokovali su nešto niži efekat (17,5 i 15,2 %, respektivno), ali ipak efikasniji od amifostina. Testirani ekstrakti apotecija lišaja *P. horizontalis* (PHA) u koncentraciji od 1,0 i 2,0 µg/ml pokazali su smanjenje frekvencije MN za 1,9 %, odnosno 5,7 % za veću koncentraciju. Jedini ekstrakt koji je pokazao porast broja MN od 3,0 % bio je ekstrakt apotecija u koncentraciji od 3,0 µg/ml, dok je alkilirajuće sredstvo MMC (kao negativna kontrola) povećao broj MN za 27,0 %. Slabiji zaštitni efekat pokazao je acetonski ekstrakti *P. horizontalis* (PH) u koncentracijama od 1,0, 2,0 i 3,0 µg/ml, smanjujući učestalost MN za 8,0, 9,5 i 3,4 % (redom) u poređenju sa kontrolnim ćelijskim kulturama. Na osnovu priloženog, zaključujemo da ekstraktu lišaja *P. horizontalis* koji sadrži i talus i apotecije, prisustvo apotecija umanjuje zaštitni efekat. Nardemir i saradnici (2015) imali su za cilj da utvrde genotoksična i antigenotoksična svojstva metanolnih ekstrakata lišajeva *P. horizontalis* i *P. praetextata*. Ispitivanja su pokazala da ne postoji mutageno dejstvo na ispitivane bakterije, i da ekstrakti (koncentracije 0,05, 0,5 i 5 µg/ploče u 10 % rastvoru DMSO) pokazuju značajnu antimutagenu aktivnost protiv jakih mutagena.

Ekstrakti lišaja *C. rangiformis* (CR) u koncentraciji od 1,0 i 2,0 µg/ml pokazali su značajno smanjenje učestalosti MN za 12,2% i 15,5 % (redom) u odnosu na kontrolne ćelijske kulture, dok je isti ekstrakt u koncentraciji od 3,0 µg/ml uzrokovao smanjenje frekvencije MN



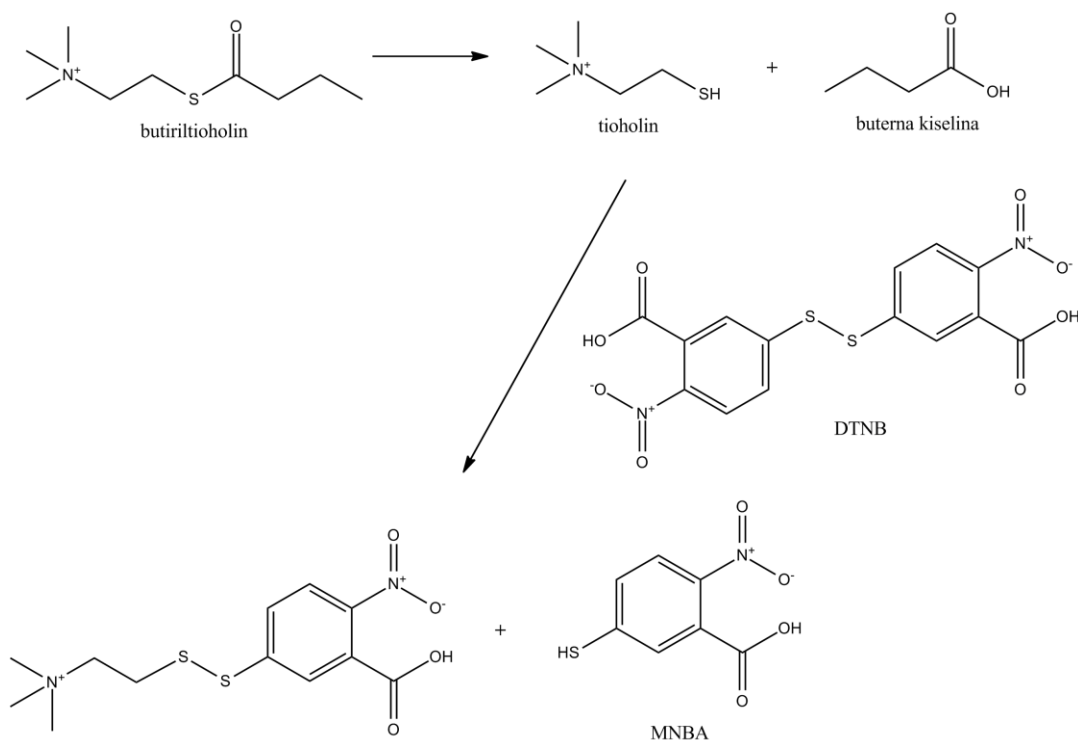
od 8,4 %. Kotan i saradnici (2013) utvrdili su da metanolni ekstrakt *C. rangiformis* (u koncentraciji od 5 i 10 µg/ml) pokazuje antigenotoksični efekat smanjujući genotoksičnost indukovanu aflatoksinom B1, što može smanjiti rizik od kancerogeneze prouzrokovane aflatoksinom B1. Genotoksičnost metanolnog ekstrakta *C. rangiformis* ispitivali su i Gulluce i saradnici (2011), pri čemu su dokazali da ekstrakt pruža značajna antimutagena svojstva.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da mnogi sekundarni metaboliti lišajeva pokazuju inhibitornu aktivnost protiv raznih ćelijskih kancera. Rezultati ispitivanja od strane Koparal i saradnika (2006) pokazali su da oba enantiomera usninske kiseline nisu genotoksična i imaju značajnu *in vitro* citotoksičnu aktivnost (čak i u malim dozama) na ćelije humanih limfocita iz kacinoma plućnog epitela. Bačkorová i saradnici (2011) pokazali su da usninska kiselina, atranorin, giroforna kiselina i parietin poseduju citotoksičnu/proliferativnu aktivnost protiv devet vrsta humanih ćelija raka. Kosanić i saradnici (2014<sup>a</sup>) dokazali su značajni citotoksični efekat atranorina i fumaroprotocetrarične kiseline izolovanih iz lišajeva roda *Cladonia*. Veliku *in vitro* citotoksičnu aktivnost pokazali su protocetrarična i salazinska kiselina u poređenju sa usninskom kiselinom, koja je upotrebljena kao standard u istraživanju od strane Manojlović i saradnika (2012<sup>b</sup>). Benn i saradnici (1998) pokazali su marginalnu citotoksičnost rangiformne kiseline izolovane iz *Cladonia retipora*.

Našim ispitivanjem zaštitnog efekta otkrili smo da je testirani ekstrakt talusa lišaja *P. horizontalis* (PHT) vršio najveće blagotvorno dejstvo na ćelije limfocita, dajući značajno smanjenje učestalosti MN upoređujući sa kontrolnim ćelijama i amifostinom, u odnosu na ostale acetonske ekstrakte ispitivanih vrsta lišajeva.

### **3.7. Uticaj acetonskih ekstrakata odabranih vrsta lišajeva na aktivnost holinesteraze**

Aktivnost holinesteraze određena je Elmanovom metodom gde se kao supstrat koristi butiriltioholin koji pod dejstvom serumske holinesteraze hidrolizuje do butirata i tioholina. Oslobođeni tioholin reaguje sa DTNB (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoevom kiselinom)) pri čemu nastaje žuto obojeni 5-tio-2-nitrobenzoat (Slika 31).



**Slika 31.** Reakcije na kojima se zasniva određivanje aktivnosti holinesteraze

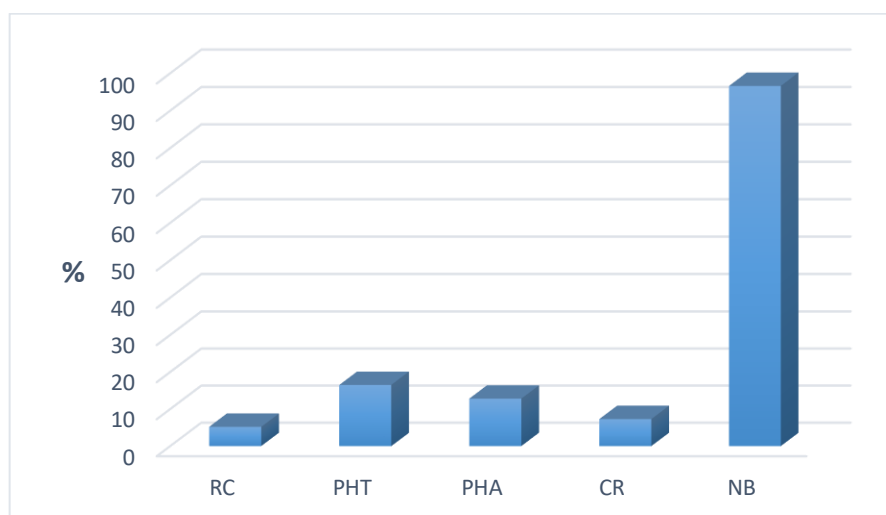
Aktivnost serumske holinesteraze određena je delovanjem acetonskih ekstrakata lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis* i komercijalnog inhibitora holinesteraze, neostigmin-bromida, a rezultati su dati u Tabeli 17. Za ispitivanje su korišćeni uzorci ekstrakata u koncentraciji od 1 i 10 mg/ml, dok je koncentracija neostigmin-bromida bila 0,2 mg/ml.

Acetonski ekstrakti frutikoznih lišajeva *R. capitata* i *C. rangiformis* u koncentraciji od 1 mg/ml ispoljavaju slab aktivirajući efekat, dok ekstrakti talusa i apotecija folioznog lišaja *P. horizontalis* pri istoj koncentraciji pokazuju neznatan inhibirajući efekat na aktivnost holinesteraze u poređenju sa neostigmin-bromidom. Nešto jači inhibirajući efekat pokazali su svi acetonski ekstrakti u koncentraciji od 10 mg/ml sa udelom od 5,2 % za *R. capitata*, 7,3 % za *C. rangiformis*, i 16,5 % i 12,8 % za talus i apotecije lišaja *P. horizontalis* (redom). Ipak, ispoljena inhibirajuća dejstva acetonskih ekstrakata lišajeva su daleko ispod inhibirajućeg efekta standardnog inhibitora holinesteraze, neostigmin-bromida (96,6 %) (Slika 32). Na osnovu rezultata, zaključujemo da se povećanjem koncentracije acetonskih ekstrakata povećava i sposobnost inhibicije holinesterazne aktivnosti.

**Tabela 17.** Uticaj acetonskih ekstrakata na aktivnost holinesteraze (izraženo u %)

Uzorak	Koncentracija (mg/ml)	(-) Inhibicija/(+) aktivacija holinesteraze (%)
<i>R. capitata</i>	1,0	+ 2,8
<i>R. capitata</i>	10,0	- 5,2
<i>P. horizontalis</i> (talus)	1,0	- 1,1
<i>P. horizontalis</i> (talus)	10,0	- 16,5
<i>P. horizontalis</i> (apotecije)	1,0	- 0,4
<i>P. horizontalis</i> (apotecije)	10,0	- 12,8
<i>C. rangiformis</i>	1,0	+ 2,0
<i>C. rangiformis</i>	10,0	- 7,3
Neostigmin-bromid	0,2	- 96,6

U prethodnim istraživanjima, dokazana je holinesterazna inhibitorna aktivnost sekundarnih metabolita izolovanih iz lišajeva *C. macilenta* (Luo i saradnici, 2013) i *C. portentosa* (Reddy i saradnici, 2016). Zlatanović (2019) je pokazala da acetonski ekstrakti *E. prunastri* i *H. tubulosa* poseduju inhibirajući efekat od 22,2% i 26,6% (redom) na acetilholinesterazu.



**Slika 32.** Inhibirajući efekat acetonskih ekstrakata lišajeva i standardnog inhibitora na aktivnost holinesteraze. (RC – *R. capitata*, PHT – talus *P. horizontalis*, PHA – apotecije *P. horizontalis*, CR – *C. rangiformis*, NB – neostigmin-bromid).

## 4. ZAKLJUČAK

Cilj doktorske disertacije “Analiza hemijskog sastava i biološke aktivnosti lišajeva *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl., *Peltigera horizontalis* (Hudson) Baumg. i *Cladonia rangiformis* Hoffm.” bio je određivanje:

- ✓ hemijskog sastava acetonskih, etil-acetatanih, etarskih i dihlormetanskih ekstrakata lišajeva *R. capitata*, *P. horizontalis* i *C. rangiformis*;
- ✓ sadržaja makro- i mikroelemenata u sušenom lišajevskom materijalu i
- ✓ antioksidativne i antibakterijske aktivnosti acetonskih ekstrakata, kao i uticaja acetonskih ekstrakata na formiranje mikronukleusa u limfocitima humane krvne plazme i aktivnost serumske holinesteraze.

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- HPLC analizom ispitivanih ekstrakata lišajeva, utvrđeno je prisustvo sekundarnih metabolita iz grupa depsida (evernična kiselina, obtusinska kiselina, atranorin, tenuiorin i girofona kiselina), depsidona (fumarprotocetrarična kiselina), dibenzofurana (usninska kiselina) i monoaromatičnih jedinjenja (everninična kiselina i atrarična kiselina).
  - ✓ Evernična kiselina identifikovana je kao glavna komponenta u svim ekstraktima lišaja *R. capitata*.
  - ✓ U acetonskom, etil-acetatnom i etarskom ekstraktu lišaja *R. capitata* obtusinska kiselina i everninična kiselina druge su po redu zastupljenosti, praćene prisustvom usninske kiseline i atranorina.
  - ✓ Usninska kiselina predstavlja drugu zastupljenu komponentu dihlormetanskog ekstrakta lišaja *R. capitata*.
  - ✓ Najzastupljenija komponenta svih ispitivanih ekstrakata celokupnog lišaja i apotecija lišaja *P. horizontalis* je tenuiorin, praćen metil-giroforatom i giroforanom kiselinom.
  - ✓ Glavna komponenta svih ispitivanih ekstrakata talusa lišaja *P. horizontalis* je metil-giroforat, praćen prisustvom giroforne kiseline.
  - ✓ Atranorin je najzastupljeniji konstituent svih ispitivanih ekstrakata lišaja *C. rangiformis*, praćen prisustvom fumarprotocetrarične i atrarične kiseline.
- GC-MS analizom ispitivanih ekstrakata lišajeva, utvrđeno je prisustvo lako isparljivih sekundarnih metabolita koji spadaju u grupu derivata orcinola/ $\beta$ -orcinola ili orselinske

kiseline/ $\beta$ -orselinske kiseline, dibenzofurana, derivata trikarboksilne kiseline, masnih kiselina i njihovih estera i sterola.

- ✓ Glavne isparljive komponente etil-acetatnog, etarskog i dihlormetanskog ekstrakta lišaja *R. capitata* su everninična kiselina, orcinol i usninska kiselina (redom), praćena orcinol-monometil-etrom i 3-metilorselinskom kiselinom.
  - ✓ Etarski ekstrakt karakteriše prisustvo metil-3,5,6-trimetilrezorcilata, a etil-acetatni ekstrakt 2-hidroksi-4-metoksi-3,5,6-trimetilbenzojeve kiseline.
  - ✓ Orcinol i orcinol-monometil-etar su najzastupljeniji isparljivi konstituenti acetonskog ekstrakta lišaja *R. capitata*, praćeni sparasolom i metil-estrima masnih kiselina (metil-palmitat, metil-linoleat i metil-linolenat).
  - ✓ Metil-orselinat je najzastupljenija komponenta svih ispitivanih ekstrakata lišaja *P. horizontalis*, osim etarskih ekstrakata talusa i apotecija kod kojih je glavna komponenta dodecil-akrilat, praćeni orcinolom i orcinol-monometil-etrom.
  - ✓ Dihlormetanski ekstrakt celokupnog lišaja *P. horizontalis* odlikuje se prisustvom everninične kiseline.
  - ✓ U svim ispitivanim ekstraktima lišaja *C. rangiformis* najzastupljenija isparljiva komponenta je rangiformna kiselina, praćena atraričnom kiselinom i atranolom.
  - ✓ Steroli su identifikovani u svim etil-acetatnim i dihlormetanskim ekstraktima ispitivanih lišajeva, kao i u etarskom ekstraktu *R. capitata* i acetonskim ekstraktima *P. horizontalis*. Njihova zastupljenost je veća u *P. horizontalis* nego u *R. capitata*, dok su u *C. rangiformis* prisutni u tragovima.
  - ✓ Steroli prisutni u ekstraktima predstavljaju integralne konstituente lišajeva jer su vrste sakupljene sa stene i zemljišta, tako da se isključuje mogućnost migracije jedinjenja sa drveta domaćina na talus lišaja.
- ICP-OES analizom određen je sadržaj 5 makroelemenata (Ca, K, Mg, Na i P) i 15 mikroelemenata (Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Si, V i Zn) u odabranim vrstama lišajeva.
- ✓ Foliozni tip lišaja *P. horizontalis* ima najveći sadržaj makroelemenata (osim Na) u odnosu na frutikozne vrste lišajeva. Sadržaj Na je najveći u lišaju *R. capitata*.
  - ✓ Redosled sadržaja makroelemenata u odabranim vrstama lišajeva je Ca > K > P > Mg > Na, sa izuzetkom u sadržaju K, koji je u lišaju *P. horizontalis* prisutan u većoj količini od Ca, što ga svrstava u element sa najvećom količinom od svih ispitivanih makroelemenata.

- ✓ Lišaj *P. horizontalis* ima najveći sadržaj mikroelemenata, izuzev Co, Pb i Si, čiji je sadržaj najveći u lišaju *R. capitata*.
- ✓ Živa je detektovana samo u lišaju *R. capitata*, koji je sakupljen sa drugačijeg lokaliteta u odnosu na druge vrste, dok mikroelementi As, Se, Be i Tl nisu detektovani ni u jednoj ispitivanoj vrsti lišaja.
- ✓ Ne postoji pravilnost u zastupljenosti makro- i mikroelemenata u uzorcima frutikoznih lišajeva koji rastu na steni (*R. capitata*) ili zemljištu (*C. rangiformis*).
- Ispitana je antioksidativna aktivnost acetonskih ekstrakata odabranih lišajeva primenom pet različitih metoda, i dobijeni su sledeći rezultati:
  - ✓ Bolju sposobnost neutralizacije DPPH i ABTS radikala poseduju uzorci sa istog lokaliteta – acetonski ekstrakti lišaja *P. horizontalis* i ekstrakt lišaja *C. rangiformis*, nego acetonski ekstrakt lišaja *R. capitata*.
  - ✓ Vrednosti ukupne redukcionne moći su približno iste za sve ekstrakte, pri čemu najveću vrednost pokazuje ekstrakt lišaja *R. capitata* a najmanju vrednost ima ekstrakt lišaja *P. horizontalis*.
  - ✓ Sadržaj ukupnih fenola opada u nizu: *R. capitata*, *P. horizontalis* (apotecije i talusa), *C. rangiformis*, *P. horizontalis* (celokupni lišaj).
  - ✓ Ne postoji potpuna korelacija fenolnog sadržaja ekstrakata lišaja *R. capitata* i sposobnosti neutralisanja DPPH i ABTS radikala, dok kod ostalih ekstrakata postoji pozitivna korelacija.
  - ✓ Najbolju sposobnost redukcije Cu (II) do Cu (I) pokazuje acetonski ekstrakt lišaja *C. rangiformis*, praćen lišajem *P. horizontalis*, dok najslabiju sposobnost redukcije poseduje acetonski ekstrakt lišaja *R. capitata*.
  - ✓ Acetonski ekstrakt celokupnog lišaja *P. horizontalis* poseduje slabiji antioksidativni efekat u svim ispitivanim metodama, nego njegovi pojedinačni delovi (talus i apotecije).
  - ✓ Acetonski ekstrakt apotecija pokazuje jaču antioksidativnu sposobnost u svim ispitivanim metodama od ekstrakta talusa, što se potencijalno može pripisati prisustvu tridepsida tenuiorina (peltigerina) koji predstavlja glavnu komponentu apotecija, dok u talusu nije identifikovan.
- Antibakterijska aktivnost acetonskih ekstrakata odabranih lišajeva je ispitana disk-difuzionom metodom na dve Gram-pozitivne (*Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* i

*Staphylococcus aureus*) i tri Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella abony*). Dobijeni su sledeći rezultati:

- ✓ Najveću antimikrobnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija imao je ekstrakt lišaja *R. capitata* za bakteriju *B. subtilis* ssp. *spizizenii*, dok se nešto slabiji antimikrobni efekat pokazao kod bakterije *S. aureus*.
  - ✓ Acetonski ekstrakt lišaja *C. rangiformis* poseduje antimikrobnu aktivnost protiv Gram-pozitivne bakterije soja *S. aureus*.
  - ✓ Acetonski ekstrakt lišaja *P. horizontalis* ne poseduje antimikrobnu aktivnost protiv ispitivanih bakterija.
  - ✓ Gram-negativne bakterije bile su rezistentne na dejstvo acetonskih ekstrakata svih ispitivanih vrsta lišajeva.
- Ispitan je uticaj različitih koncentracija acetonskih ekstrakata lišajeva na formiranje mikronukleusa u limfocitima humane krvne plazme, pri čemu svi ekstrakti u koncentraciji od 2 µg/ml izazivaju najveće smanjenje učestalosti mikronukleusa, a među njima ekstrakt talusa *P. horizontalis* najveće.
- Ispitan je uticaj acetonskih ekstrakata na aktivnost holinesteraze, pri čemu ekstrakti talusa i apotecija lišaja *P. horizontalis* pokazuju najveći inhibirajući efekat, međutim, ispoljena inhibirajuća dejstva su daleko ispod inhibirajućeg efekta standardnog inhibitora holinesteraze, neostigmin-bromida.

U ovoj disertaciji prvi put je određen:

- ✓ sastav isparljivih metabolita lišajeva *R. capitata* i *P. horizontalis*,
- ✓ sadržaj makro- i mikroelemenata u lišajevima *P. horizontalis* i *C. rangiformis*,
- ✓ antioksidativna aktivnost CUPRAC metodom i uticaj na dejstvo holinesterazne aktivnosti ispitivanih vrsta lišajeva,
- ✓ uticaj na učestalost mikronukleusa u ćelijama humanih limfocita acetonskih ekstrakata lišajeva *P. horizontalis* i *C. rangiformis*, i
- ✓ konstituent dodecil-akrilat u lišajevskom materijalu.

## 5. LITERATURA

1. Açıkgöz B, Karalti I, Ersöz M, Coşkun Z, Çobanoğlu G, Sesal C. (2013). Screening of antimicrobial activity and cytotoxic effects of two *Cladonia* species. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(5-6): 191-197.
2. Adams RP. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Carol Stream (IL): Allured Publishing Corporation.
3. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Bektaşoğlu B, Bener M. (2009). Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for antioxidants in human serum and for hydroxyl radical scavengers. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, 215-239.
4. Asahina Y, Shibata S. (1954). *Chemistry of Lichen Substances*, Tokyo: Japan Society for the Promotion of Science.
5. Aslan A, Budak G, Karabulut A. (2004). The amounts Fe, Ba, Sr, K, Ca and Ti in some lichens growing in Erzurum province (Turkey). *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 88: 423-431.
6. Bačkorová M, Bačkor M, Mikeš J, Jendželovský R, Fedoročko P. (2011). Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicology in Vitro*, 25(1): 37-44.
7. Benesperi R, Tretiach M. (2004). Differential land snail damage to selected species of the lichen genus *Peltigera*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(2): 127-138.
8. Benn MH, Lorimer SD, Perry NB. (1998). Revision of structure of rangiformic acid. *Phytochemistry*, 47(8): 1649-1652.
9. Bergerud AT. (1972). Food Habits of Newfoundland Caribou. *The Journal of Wildlife Management*, 36(3): 913-923.
10. Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10(6-7): 499-503.
11. Bown D. (2001). *Encyclopedia of herbs and their uses*, London: Dorling Kindersley.
12. Brakni R, Ali Ahmed M, Burger P, Schwing A, Michel G, Pomares C, Hasseine L, Boyer L, Fernandez X, Landreau A, Michel T. (2018). UHPLC-HRMS/MS Based Profiling of Algerian Lichens and Their Antimicrobial Activities. *Chemistry & Biodiversity*, 15(4): e1800031, doi: 10.1002/cbdv.201800031.



13. Brakni R, Ali Ahmed M. (2018). Antibacterial Activity of the Chloroform, Acetone, Methanol and aqueous Extracts of Algerian Lichens. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(2): 55-67.
14. Brennan J, Vaden M, Lester C, Crixell S, Vattem D. (2009). Biological activity of some common lichens. *The FASEB Journal*, 23: 716.10.
15. Candan M, Yılmaz M, Tay T, Kıvanç M, Türk H. (2006). Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Xanthoparmelia pokornyi* and its gyrophoric and stenosporic acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61: 319-323.
16. Cansaran D, Atakol O, Halici MG, Aksoy A. (2007). HPLC analysis of usnic acid in some *Ramalina* species from Anatolia and investigation of their antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, 45(1): 77-81.
17. Coşkun Z, Ersöz M, Açıkgöz B, Karalti I, Çobanoğlu G, Sesal C. (2015). Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Methanolic Extracts from Different *Cladonia* Species on Human Breast Cancer Cells. *Folia Biologica*, 61(3): 97-103.
18. Countryman PI, Heddle JA. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41: 321-332.
19. Culberson CF, Culberson WL, Johnson A. (1990). The *Ramalina americana* Complex (Ascomycotina, Ramalinaceae): Chemical and Geographic Correlations. *The Bryologist*, 93(2): 167-186.
20. Culberson CF. (1969). Chemical Studies in the Genus *Lobaria* and the Occurrence of a New Tridepside, 4-O-Methylgyrophoric Acid. *The Bryologist*, 72(1): 19-27.
21. Dayan FE, Romagni JG. (2001). Lichens as a potential source of pesticides. *Pesticide Outlook*, 12: 229-232.
22. de Mayolo AKK. (1989). Peruvian Natural Dye Plants. *Economic Botany*, 43(2): 181-191.
23. de Vries B, de Vries I. (2008). *Common lichens of Cypress hills interprovincial park Saskatchewan, Canada*, Saskatchewan: Fish and Wildlife Branch, Ministry of Environment.
24. Deduke C, Timsina B, Piercey-Normore MD. (2012). *Effect of environmental change on secondary metabolite production in lichen-forming fungi*. In: Young S, Silvern S (Ed). *International perspectives on global environmental change (197-230)*, Rijeka: InTech.

25. Delebassée S, Mambu L, Pinault E, Champavier Y, Liagre B, Millot M. (2017). Cytochalasin E in the lichen *Pleurosticta acetabulum*. Anti-proliferative activity against human HT-29 colorectal cancer cells and quantitative variability. *Fitoterapia*, 121: 146-151.
26. Dévéhat F, Tomasi S, Elix JA, Bernard A, Rouaud I, Uriac P, Boustie J. (2007). Stictic Acid Derivatives from the Lichen *Usnea articulata* and Their Antioxidant Activities. *Journal of Natural Products*, 70: 1218-1220.
27. Dool HVD, Kratz PD. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11: 463-471.
28. Elix JA, Jenie UA, Parker JL. (1987). A novel synthesis of the lichen depsidones divaronic acid and stenosporonic acid and the biosynthetic implications. *Australian Journal of Chemistry*, 40(8): 1451-1464.
29. Elix JA. (1996). *Biochemistry and secondary metabolites*. In: Nash TH (Ed). *Lichen Biology* (154-180), Cambridge: Cambridge University Press.
30. Fenech M, Morley AA. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutation Research*, 285: 35-44.
31. Ferreira ES, Hulme AN, McNab H, Quye A. (2004). The natural constituents of historical textile dye. *Chemical Society Reviews*, 33(6): 329-336.
32. Garty J. (2001). Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 20: 309-371.
33. Geyikoglu F, Turkez H, Aslan A. (2007). The protective roles of some lichen species on colloidal bismuth subcitrate genotoxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 23: 487-492.
34. González-Tejero MR, Martínez-Lirola MJ, Casares-Porcel M, Molero-Mesa J. (1995). Three lichens used in popular medicine in Eastern Andalusia (Spain). *Economic Botany*, 49(1): 96-98.
35. Goward T, Goffinet B, Vitikainen O. (1995). Synopsis of the genus *Peltigera* (lichenized Ascomycetes) in British Columbia, with a key to the North American species. *Canadian Journal of Botany*, 73(1): 91-111.

36. Goward T, McCune B, Meidinger D. (1994). *The Lichens of British Columbia, Illustrated Keys, Part 1 - Foliose and Squamulose Species*, Victoria: Research Program, Ministry of Forests.
37. Gulluce M, Agar G, Aslan A, Karadayi M, Bozari S, Orhan F. (2011). Protective effects of methanol extracts from *Cladonia rangiformis* and *Umbilicaria vellea* against known mutagens sodium azide and 9-aminoacridine. *Toxicology and Industrial Health*, 27(8): 675-682.
38. Halici M, Kufrevioglu OI, Odabasoglu F, Halici Z, Cakir A, Aslan A. (2011). The ethanol-water extract of *Ramalina capitata* has gastroprotective and antioxidative properties: An experimental study in rats with indomethacin-induced gastric injuries. *Journal of Food Biochemistry*, 35(1): 11-26.
39. Hauck M, Jürgens SR, Willenbruch K, Huneck S, Leuschner C. (2009). Dissociation and metal-binding characteristics of yellow lichen substances suggest a relationship with site preferences of lichens. *Annals of Botany*, 103(1): 13-22.
40. Heinrich G, Pfeifhofer HW, Stabentheiner E, Sawidis T. (2002). Glandular hairs of *Sigesbeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae): morphology, histochemistry and composition of essential oil. *Annali di Botanica (Rome)*, 89: 459-469.
41. Hidalgo ME, Fernandez E, Quilhot W, Lissi E. (1994). Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry*, 37(6): 1585-1587.
42. Houshyar F, Jamshidi S, Sohrabi M. (2014). Antimicrobial in Vitro and in Vivo Potential of Five Lichen Species on *Fusarium Equiseti* and *Pectobacterium Carotovora* Pv. *Carotovora* Causal Agents of Potato Rots. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(4): 412-417.
43. Huneck S, Feige GB, Schmidt J. (2004). Chemie von *Cladonia furcata* und *Cladonia rangiformis*. *Herzogia*, 17: 51-58.
44. Huneck S, Yoshimura I. (1996). *Identification of Lichen Substances*, Berlin: Springer-Verlag.
45. Ingólfssdóttir K, Bloomfield SF, Hylands PJ. (1985). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28(2): 289-292.
46. Ingólfssdóttir K, Chung GAC, Skúlason, VG, Gissurarson SR, Vilhelmsdóttir M. (1998). Antimycobacterial activity of lichens metabolites in vitro. *European journal of*

*pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 6: 141-144.

47. Ingólfssdóttir K, Gudmundsdóttir GF, Ögmundsdóttir HM, Paulus K, Haraldsdóttir S, Kristinsson H, Bauer R. (2002). Effects of tenuiorin and methyl orsellinate from the lichen *Peltigera leucophlebia* on 5-/15-lipoxygenases and proliferation of malignant cell lines in vitro. *Phytomedicine*, 9(7): 654-658.
48. Ingólfssdóttir K. (2002). Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7): 729-736.
49. Jamil B, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. (2007). Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1): 26-31.
50. Joo SS, Kim YI, Lee DI. (2010). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Secondary Metabolites from White Rose Flower. *The Plant Pathology Journal*, 26: 57-62.
51. Joulain D, Tabacchi R. (2009). Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss. *Flavour and Fragrance Journal*, 24: 49-61. (a)
52. Joulain D, Tabacchi R. (2009). Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 2: treemoss. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(3): 105-116. (b)
53. Kahrman N, Tosun G, Yayli B, Yazici K, Karaoglu SA, Yayli N. (2012). Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Cladonia rangiformis* Hoffm. and *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad. *Asian Journal of Chemistry*, 24(4): 1442-1444.
54. Kari PR. (1987). *Tanaina Plantlore*. Alaska Region: National Park Service.
55. Karunaratne V, Bombuwela K, Kathirgamanathar S, Thadhani VM. (2005). Lichens: a chemically important biota. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 33(3): 169-186.
56. Kekuda TRP, Lavanya D, Pooja R. (2019). Lichens as promising resources of enzyme inhibitors: A review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(2-s): 665-676.
57. Kinoshita Y, Yamamoto Y, Okuyama E, Yoshida E, Yamazaki M. (2006). Screening for inhibitory activity of monoamine oxidase in natural thalli and cultured mycobionts of lichens. *The Lichenology*, 5: 1-6.
58. Koparal AT, Tüylü BA, Türk H. (2006). In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Natural product research*, 20(14): 1300-1307.

59. Kosanić M, Ranković B, Stanojković T, Rančić A, Manojlović N. (2014). *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1): 518-525. (a)
60. Kosanić M, Ranković B, Stanojković T, Vasiljević P, Manojlović N. (2014). Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia. *EXCLI Journal*, 13: 1226-1238. (b)
61. Kosanić M, Ranković B, Sukdolak S. (2010). Antimicrobial activity of the lichen *Lecanora frustulosa* and *Parmeliopsis hyperopta* and their divaricatic acid and zeorin constituents. *African Journal of Microbiology Research*. 4 (9): 885-890.
62. Kotan E, Agar G, Alpsoy L, Aslan A, Erman F, Nardemir G. (2013). Anti-genotoxic and anti-oxidative effects of *Cladonia rangiformis* extracts against aflatoxin B1 in vitro. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22(4): 1139-1143.
63. Lee SK, Zakaria HM, Cheng HS, Luyengi L, Gamez EJC, Mehta R, Kinghorn AD, Pezzuto JM. (1998). Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 1(1): 35-46.
64. Llano GA. (1951). *Economic uses of lichens*, Annual Report Smithsonian Institution (Vol 385-422).
65. Llano GA. (1956). Utilization of lichens in the arctic and subarctic. *Economic Botany*, 10(4): 367-392.
66. Lücking R, Lawrey JD, Sikaroodi M, Gillevet PM, Chaves JL, Sipman HJM, Bungartz F. (2009). Do lichens domesticate photobionts like farmer domesticate crop? Evidence from previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. *American Journal of Botany*, 96(8): 1409-1418.
67. Luo H, Li C, Kim JC, Liu Y, Jung JS, Koh YJ, Hur JS. (2013). Biruloquinone, an acetylcholinesterase inhibitor produced by lichen-forming fungus *Cladonia macilenta*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2): 161-166.
68. Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. (2012). Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*, 19(13): 1166-1172. (b)
69. Manojlović N, Vasiljević P, Masković P, Jusković M, Bogdanović-Dušanović G. (2012). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evidence-based complementary and alternative medicine*, doi:10.1155/2012/452431. (a)

70. Martinez I, Burgaz AR, Vitikainen O, Escudero A. (2003). Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *The Lichenologist*, 35(4): 301-323.
71. Mendili M, Bannour M, Araújo MEM, Seaward MRD, Khadhri A. (2021). Lichenochemical Screening and Antioxidant Capacity of Four Tunisian Lichen Species. *Chemistry & Biodiversity*, 18(2): e2000735, doi: 10.1002/cbdv.202000735.
72. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Đekić T, Baošić R, Mutić J, Anđelković T, Bojić A. (2012). Bioindication of heavy metal pollution in the area of Southeastern Serbia by using epiphytic lichen *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale. *Biologica Nyssana*, 3(2): 53-60.
73. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Radulović N, Mladenović M, Stanković M, Topuzović M, Radojević I, Stefanović O, Vasić S, Lj Čomić. (2014). *Platismatia glauca* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI Journal*, 13: 938-953.
74. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Radulović N, Mladenović M, Stanković M, Topuzović M, Radojević I, Stefanović O, Vasić S, Čomić Lj, Šeklić D, Obradović A, Marković S. (2015). Contribution to the Knowledge of the Chemical Composition and Biological Activity of the Lichens *Cladonia foliacea* Huds. (Wild.) and *Hypogymnia physodes* (L.). *Oxidation communications*, 38: 2016-2032.
75. Molnár K, Farkas E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 65 (3-4): 157-173.
76. Moreira A, Braz-Filho R, Mussi-Dias V, Vieira I. (2015). Chemistry and Biological Activity of *Ramalina* Lichenized Fungi. *Molecules*, 20(5): 8952-8987.
77. Nardemir G, Yanmis D, Alpsoy L, Gulluce M, Agar G, Aslan A. (2015). Genotoxic, antigenotoxic and antioxidant properties of metanol extracts obtained from *Peltigera horizontalis* and *Peltigera praetextata*. *Toxicology and Industrial Health*, 31(7): 602-613.
78. Nash TH, Ryan BD, Diederich P, Gries C, Bungartz F. (2004). *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region* (Vol. 2), Tempe: Arizona State University.
79. Nash TH, Ryan BD, Gries C, Bungartz F. (2002). *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region* (Vol. 1), Arizona: Arizona State University.
80. Nash TH. (1996). *Lichen biology*, Cambridge: Cambridge University Press.
81. Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus MC, George WAM, Proksa B, Pommier Y. (1997). Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase:

- discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *Journal of medicinal chemistry*, 40: 942-951.
82. Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. (1995). Usnic acid and diffractin acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Medica*, 61(2): 113-115.
  83. Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
  84. Paudel B, Datta Bhattarai H, Prasad Pandey D, Seoun Hur J, Gyu Hong S, Kim IC, Han Yim J. (2012). Antioxidant, Antibacterial activity and Brine shrimp toxicity test of some Mountainous Lichens from Nepal. *Biological Research*, 45(4): 387-391.
  85. Pino-Bodas R, Laakso I, Stenroos S. (2017). Genetic variation and factors affecting the genetic structure of the lichenicolous fungus *Heterocephalacria bachmannii* (Filobasidiales, Basidiomycota). *PLoS One*, 12(12): e0189603.
  86. Proksa B, Adamcová J, Sturdíková M, Fуска J. (1994). Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and their inhibition potential of proteolytic enzymes. *Pharmazie*, 49(4): 282-283.
  87. Proksa B, Sturdíková M, Prónayová N, Liptaj T. (1996). (-) Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. *Pharmazie*, 51(3): 195-196.
  88. Rana VS, Blazquez MA. (2007). Chemical constituents of *Gynura cusimbua* aerial parts. *Journal of Essential Oil Research*, 19(1): 21-22.
  89. Ranković B, Kosanić M. (2015). *Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites*. In: Ranković B (Ed). *Lichen secondary metabolites bioactive properties and pharmaceutical potential* (1-26), Cham: Springer International Publishing Switzerland.
  90. Rao DN, LeBlanc F. (1965). A Possible Role of Atranorin in the Lichen Thallus. *The Bryologist*, 68(3): 284-289.
  91. Re R, Pellegrini N, Proreggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
  92. Reddy R. G, Veeraval L, Maitra S, Chollet-Krugler M, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J, Chakravarty S. (2016). Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine*, 23(12): 1527-1534.

93. Richardson DHS. (1974). *The Vanishing Lichens. Their History, Biology and Importance (section on human uses)*, New York: Hafner Press.
94. Richardson DHS. (1991). *Lichens and man*. In: Hawksworth DL (Ed). *Frontiers in mycology (187-210)*, Wallingford: CAB International.
95. Saklani A, Upreti DK. (1992). Folk uses of some lichens in Sikkim. *Journal of Ethnopharmacology*, 37(3): 229-233.
96. Salgado F, Caballero J, Vargas R, Cornejo A, Areche C. (2018). Continental and Antarctic Lichens: isolation, identification and molecular modeling of the depside tenuiorin from the Antarctic lichen *Umbilicaria antarctica* as tau protein inhibitor. *Natural Product Research*, 34(5): 1-5.
97. Sanchez W, Maple JT, Burgart LJ, Kamath PS. (2006). Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary supplement containing usnic acid. *In Mayo Clinic Proceedings*, 81(4): 541-544.
98. Santos LC, Honda NK, Carlos IZ, Vilegas W. (2004). Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. *Fitoterapia*, 75: 473-479.
99. Santos-Sánchez FN, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B. (2019). *Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism*. In: Shalaby E (Ed). *Antioxidants* (doi:10.5772/intechopen.85270), London: IntechOpen Limited.
100. Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2): 397-402.
101. Schulz H, Albroscheit G. (1989). Characterization of oakmoss products used in perfumery by highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 466: 301-306.
102. Seshadri TR. (1944). A theory of biogenesis of lichen depsides and depsidones. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*, 20(1): 1-14.
103. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
104. Sisodia R, Geol M, Verma S, Rani A, Dureja P. (2013). Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. *Natural Product Research*, 27(23): 2235-2239.



105. Smith CW, Aptroot A, Coppins BJ, Fletcher A, Gilbert OL, James PW, Wolseley PA. (2009). *The lichens of Great Britain and Ireland*, London: The British Lichen Society.
106. Stamenković S, Mitrović T, Cvetković V, Krstić N, Baošić R, Marković M, Nikolić ND, Marković V, Cvijan M. (2013). Biological Indication of Heavy Metal Pollution in the Areas of Donje Vlase and Cerje (Southeastern Serbia) Using Epiphytic Lichens. *Archives of Biological Sciences*, 65: 151-159.
107. Stankov Jovanović V, Nikolić Mandić S, Mandić Lj, Mitić V. (2007). A modification of the kinetic determination of pancuronium bromide based on its inhibitory effect on cholinesterase. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 21: 124-131.
108. Stanković M, Tešević V, Vajs V, Todorović N, Milosavljević S, Gođevac D. (2007). Antioxidant properties of grape seed extract on human lymphocyte oxidative defence. *Planta Medica*, 74: 730-735.
109. Stein SE. (1990). National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectral Database and Software, Version 3.02., USA.
110. Stojanović G, Zlatanović I, Lazarević N, Mitić V, Đorđević A, Stanković M, Zlatković B. (2018). Contribution to the knowledge of the chemical composition, biological activities and activity concentration of <sup>40</sup>K, <sup>137</sup>Cs, <sup>226</sup>Ra and <sup>232</sup>Th of the lichen *Evernia prunastri*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 83(11): 1209-1221.
111. Stojanović I, Radulović N, Mitrović T, Stamenković S, Stojanović G. (2011). Volatile constituents of selected *Parmeliaceae* lichens. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76: 987-994.
112. Studzińska-Sroka E, Galanty A, Bylka W. (2017). Atranorin – An Interesting Lichen Secondary Metabolite. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17: 1633-1645.
113. Süleyman H, Yildirim D, Aslan A, Göçer F, Gepdiremen A, Güvenalp Z. (2002). An investigation of the antiinflammatory effects of an extract from *Cladonia rangiformis* HOFFM. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(1): 10-13.
114. Taguchi H, Sankawa U, Shibata S. (1969). Biosynthesis of natural products. VI. Biosynthesis of usnic acid in lichens. A general scheme of biosynthesis of usnic acid. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 17(10): 2054-2060.
115. Taylor TN, Hass H, Remy W, Kerp H. (1995). The oldest fossil lichen. *Nature*, 378 (6554): 244.

116. Turner NJ, Thomas J, Carlson RT, Ogilvie RT. (1983). *Ethnobotany of the Nitinaht Indians of Vancouver Island*, Victoria, British Columbia: British Columbia Provincial Museum Publications.
117. Uphof JCT. (1959). *Dictionary of economic plants*, New York: Hafner.
118. Verma N, Behera BC, Sharma BO. (2012). Glucosidase inhibitory and radical scavenging properties of lichen metabolites salazinic acid, sekikaic acid and usnic acid. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 40(1): 7-21.
119. Vitikainen O. (2009). William Nylander (1822–1899) and Lichen Chemotaxonomy. *The Bryologist*, 104(2): 263-267.
120. Vogel VJ. (1970). *American Indian Medicine*, Norman: University of Oklahoma Press.
121. Wagner KH, Reichhold S, Neubauer O. (2011). Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1229: 115-123.
122. Wang L, Narui T, Harada H, Culberson C, Culberson WL. (2001). Ethnic uses of lichens in Yunnan, China. *The Bryologist*, 104: 345-349.
123. White P, Oliveira R, Oliveira A, Serafini M, Araújo A, Gelain D, Moreira J, Almeida J, Quintans J, Quintans-Junior L, Santos M. (2014). Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review. *Molecules*, 19(9): 14496-14527.
124. Woo ER, Fujii I, Ebizuka Y, Sankawa U, Kawaguchi A, Huang S, Beale JM, Shibuya M, Mocek U, Floss HG. (1989). Nonstereospecific proton removal in the enzymatic formation of orsellinic acid from chiral malonate. *Journal of the American Chemical Society*, 111(14): 5498-5500.
125. Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Koshimizu K. (1995). Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43(8): 1388-1390.
126. Yılmaz M, Türk AO, Tay T, Kıvanç M. (2004). The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (–)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(3-4): 249-254.
127. Yoshimura I, Kinoshita Y, Yamamoto Y, Huneck S, Yamada Y. (1994). Analysis of secondary metabolites from lichen by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. *Phytochemical Analysis*. 5(4): 197-205.

128. Yücel O, Odabaşoğlu F, Güllüce M, Çalik ZZ, Çakir A, Aslan A, Yazici K, Halici M. (2007). Antioxidant and antimicrobial properties of a lichen species, *Cladonia rangiformis* growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2): 101-109.
129. Zhao C, Zeng Y, Wan M, Li R, Liang Y, Li C, Zeng Z, Chau FT. (2009). Comparative analysis of essential oils from eight herbal medicines with pungent flavor and cool nature by GC–MS and chemometric resolution methods. *Journal of Separation Science*, 32(4): 660-670.
130. Zlatanović I, Stanković M, Stankov Jovanović V, Mitić V, Zrnzević I, Đorđević A, Stojanović G. (2017). Biological activities of *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey acetone extract. *Journal of Serbian Chemical Society*, 82(2): 141-150.
131. Zlatanović I. (2019). *Hemijski sastav, antibakterijska, antioksidativna i genotoksična aktivnost lišajeva Umbilicaria crustulosa (Ach.) Frey, Umbilicaria cylindrica (L.) Delise, Hypogymnia tubulosa (Schaer.) Hav. i Evernia prunastri (L.) Ach.* Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu.
132. Zopf W. (1907). *Die Flechtenstoffe in chemischer, bota-nischer, pharmakologischer und technischer Bezie-hung*, Jena: Gustav Fischer.

## 6. PRILOG

### Spisak priloga

#### UV spektri

- Prilog 1. UV spektar everninične kiselina
- Prilog 2. UV spektar atrarične kiseline
- Prilog 3. UV spektar fumarprotocetrarične kiseline
- Prilog 4. UV spektar giroforne kiseline
- Prilog 5. UV spektar evernične kiseline
- Prilog 6. UV spektar metil-giroforata
- Prilog 7. UV spektar obtusinske kiseline
- Prilog 8. UV spektar usninske kiseline
- Prilog 9. UV spektar tenuiorina
- Prilog 10. UV spektar atranorina

#### HPLC hromatogrami

- Prilog 11. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *R. capitata*
- Prilog 12. HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta lišaja *R. capitata*
- Prilog 13. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta lišaja *R. capitata*
- Prilog 14. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*
- Prilog 15. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*
- Prilog 16. HPLC hromatogram dihlormetanskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*
- Prilog 17. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*
- Prilog 18. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*
- Prilog 19. HPLC hromatogram dihlormetanskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*
- Prilog 20. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*

Prilog 21. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*

Prilog 22. HPLC hromatogram dihlormetanskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*

Prilog 23. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*

Prilog 24. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*

Prilog 25. HPLC hromatogram dihlormetanskog talusa lišaja *C. rangiformis*

### **GC-MS hromatogrami**

Prilog 26. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *R. capitata*

Prilog 27. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta lišaja *R. capitata*

Prilog 28. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta lišaja *R. capitata*

Prilog 29. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*

Prilog 30. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*

Prilog 31. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*

Prilog 32. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*

Prilog 33. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*

Prilog 34. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*

Prilog 35. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*

Prilog 36. GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*

Prilog 37. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*

Prilog 38. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*

Prilog 39. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*

Prilog 40. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*

### **Maseni spektri**

Prilog 41. (EI)MS spektar orcinola

Prilog 42. (EI)MS spektar orcinol-monometil-etra

Prilog 43. (EI)MS spektar atranola

Prilog 44. (EI)MS spektar metil-orselinata

Prilog 45. (EI)MS spektar everninične kiseline

Prilog 46. (EI)MS spektar dodecil-akrilata

Prilog 47. (EI)MS spektar atrarične kiseline

Prilog 48. (EI)MS spektar 3-metilorselinske kiseline

Prilog 49. (EI)MS spektar 2-hidroksi-4-metoksi-3,5,6-trimetilbenzoeve kiseline

Prilog 50. (EI)MS spektar metil-palmitata

Prilog 51. (EI)MS spektar metil-linoleata

Prilog 52. (EI)MS spektar rangiformne kiseline

Prilog 53. (EI)MS spektar usninske kiseline

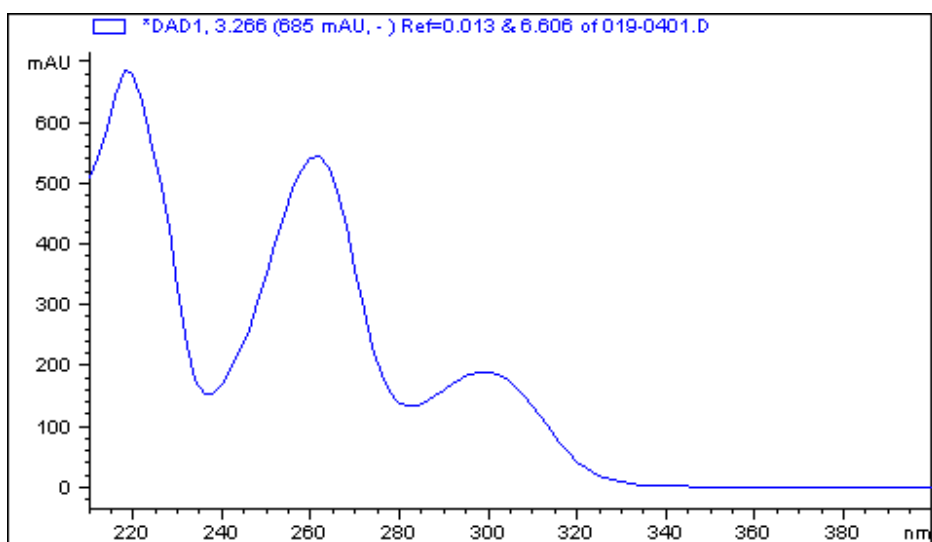
Prilog 54. (EI)MS spektar sterola 1

Prilog 55. (EI)MS spektar sterola 2

## UV spektri

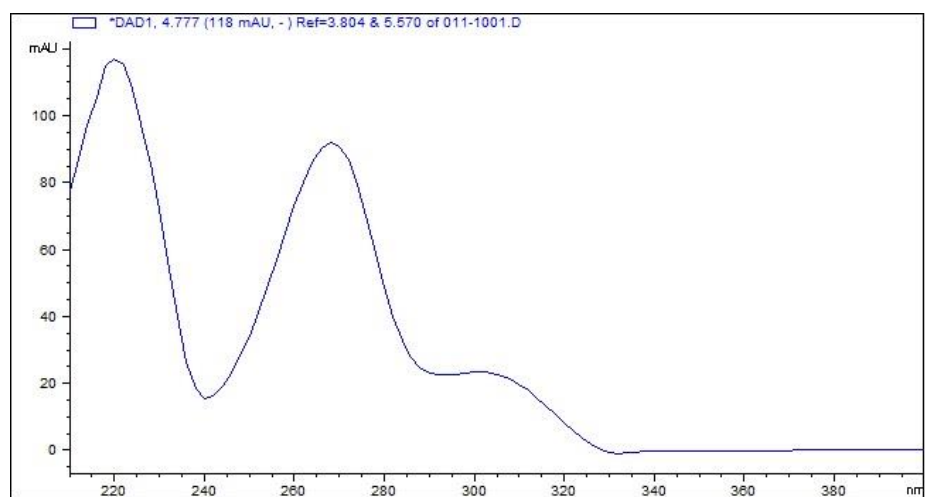
### Prilog 1. UV spektar everninične kiseline

**Everninična kiselina**,  $C_9H_{10}O_4$  (Mw 182,17 g/mol), 2-Hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoeva kiselina



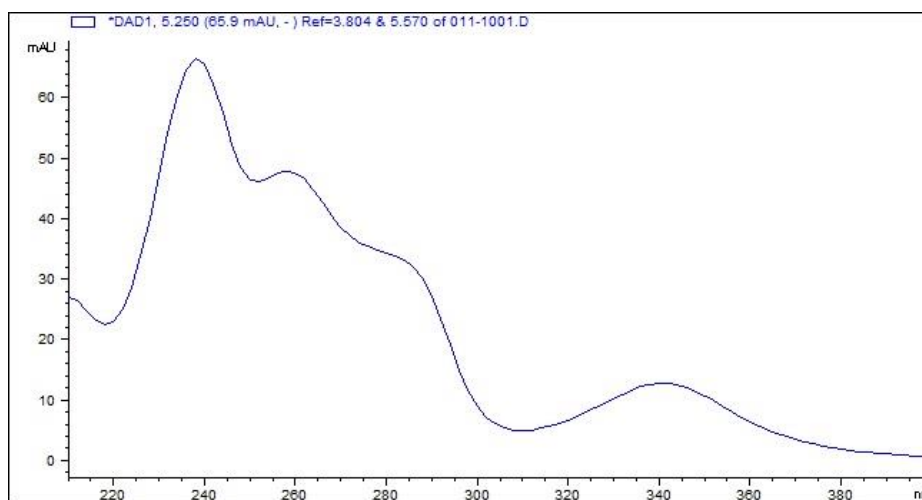
### Prilog 2. UV spektar atrarične kiseline

**Atrarična kiselina**,  $C_{10}H_{12}O_4$  (Mw 196,2 g/mol), Metil-2,4-dihidroksi-3,6-dimetilbenzoat



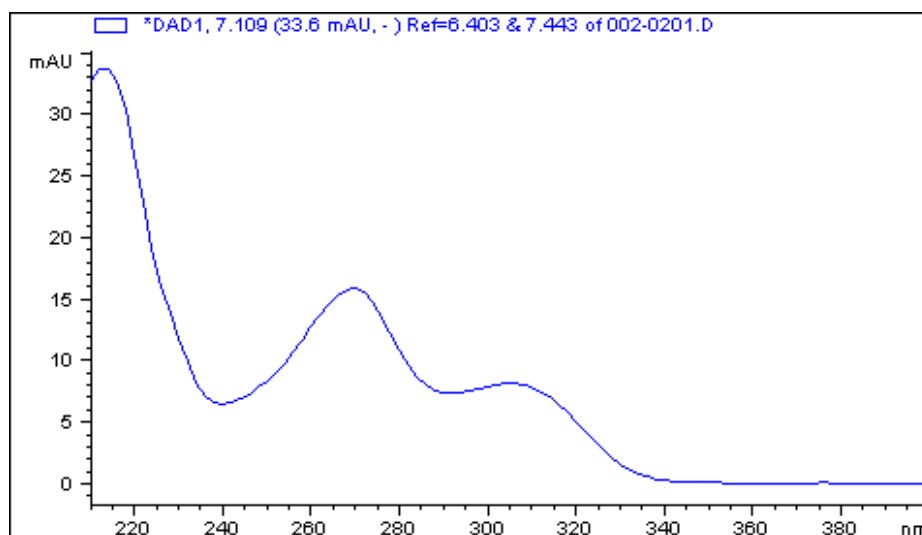
### Prilog 3. UV spektar fumarprotocetrarične kiseline

**Fumarprotocetračna kiselina**,  $C_{22}H_{16}O_{12}$  (Mw 472,4 g/mol), 4-[[*(E)*-3-Karboksi-*prop*-2-enoil]oksimetil]-10-formil-3,9-dihidroksi-1,7-dimetil-6-oksobenzo[*b*][1,4]benzodiazepin-2-karboksilna kiselina



### Prilog 4. UV spektar giroforne kiseline

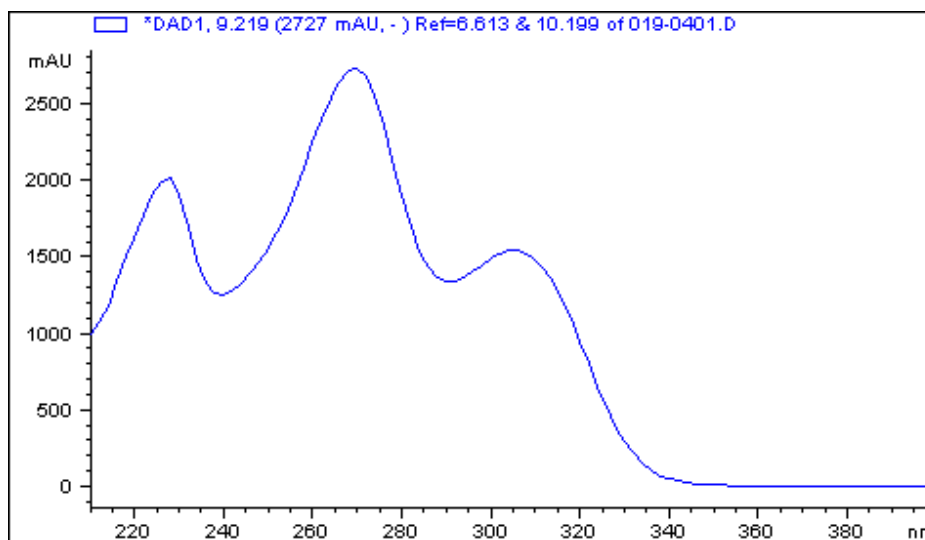
**Giroforna kiselina**,  $C_{24}H_{20}O_{10}$  (Mw 468,4 g/mol), 4-[4-(2,4-Dihidroksi-6-metilbenzoil)oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoil]oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoeva kiselina





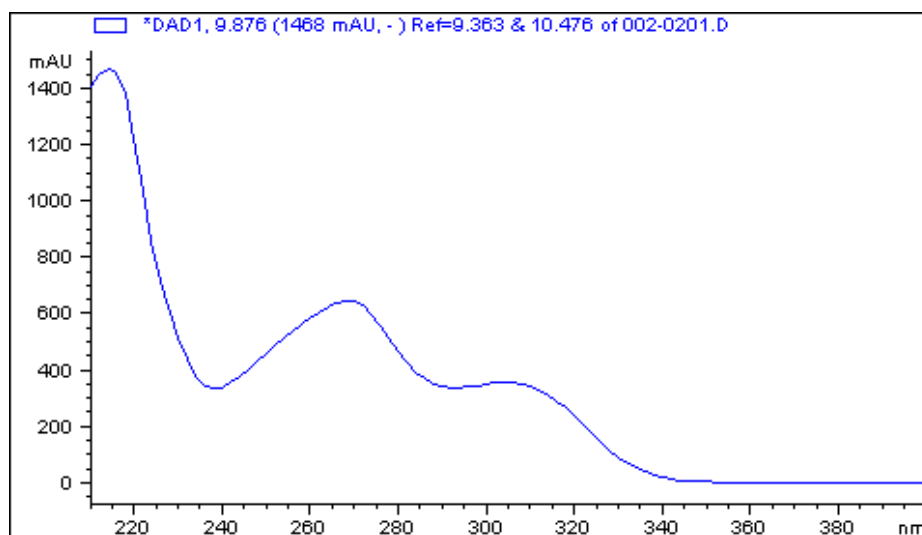
### Prilog 5. UV spektar evernične kiseline

**Evernična kiselina**,  $C_{17}H_{16}O_7$  (Mw 332,3 g/mol), 2-Hidroksi-4-(2-hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoi)oksi-6-metilbenzoeva kiselina



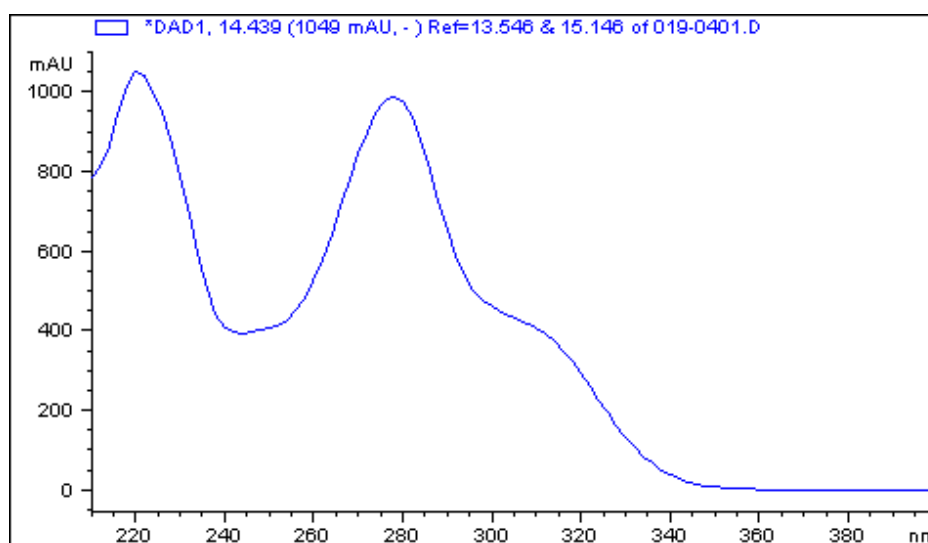
### Prilog 6. UV spektar metil-giroforata

**Metil-giroforat**,  $C_{25}H_{22}O_{10}$  (Mw 482,4 g/mol), [3-Hidroksi-4-(3-hidroksi-4-metoksikarbonil-5-metilfenoksi)karbonil-5-metilfenil]-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat



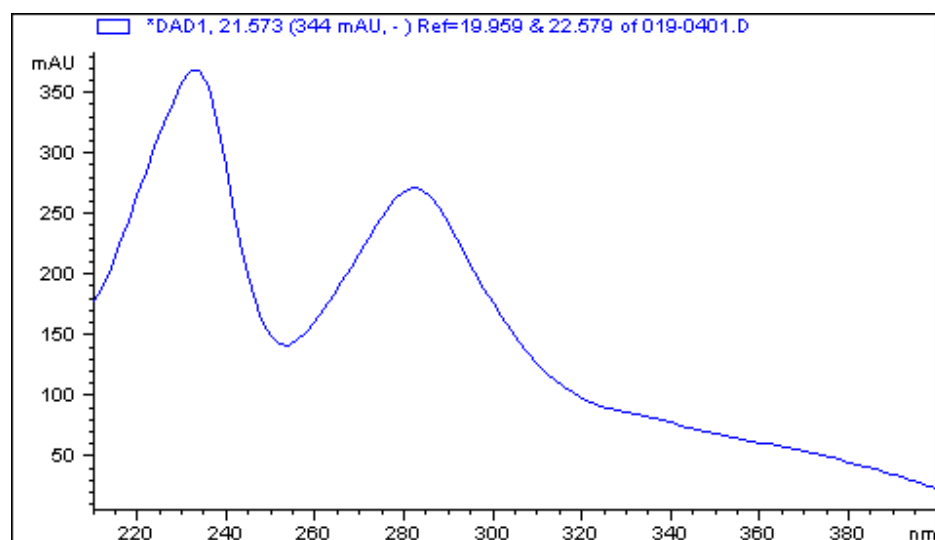
### Prilog 7. UV spektar obtusinske kiseline

**Obtusinska kiselina**,  $C_{18}H_{18}O_7$  (Mw 346,3 g/mol), 2-Hidroksi-4-(2-hidroksi-4-metoksi-3,6-dimetilbenzoil)oksi-6-metilbenzoeva kiselina



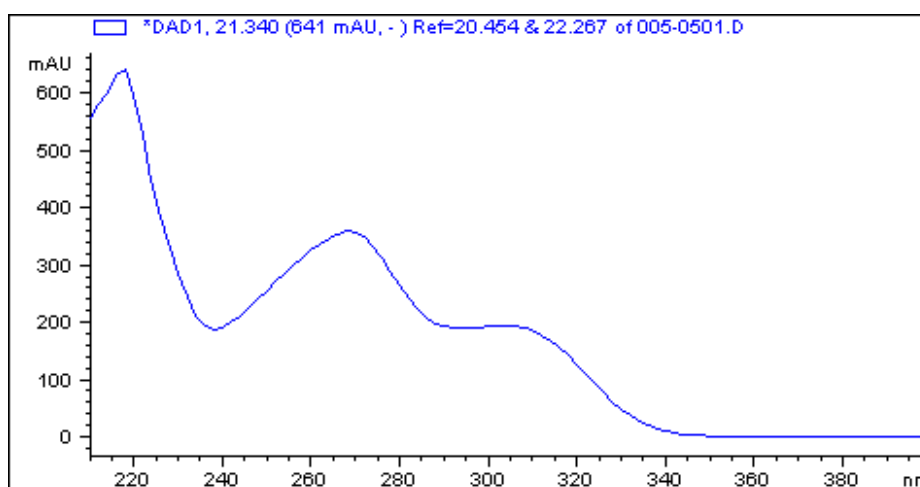
### Prilog 8. UV spektar usninske kiseline

**Usninska kiselina**,  $C_{18}H_{16}O_7$  (Mw 344,3 g/mol), 2,6-Diacetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetildibenzofuran-1,3-dione



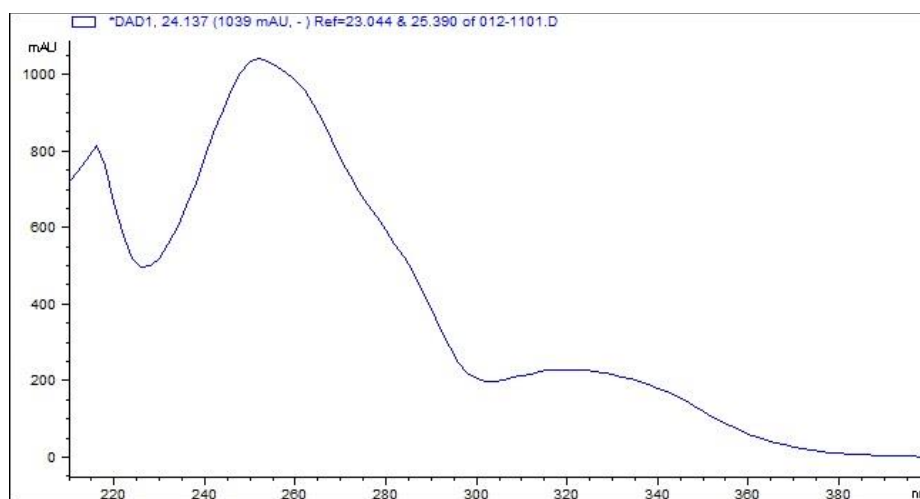
### Prilog 9. UV spektar tenuiorina

**Tenuiorin**,  $C_{26}H_{24}O_{10}$  (Mw 496,5 g/mol), [3-Hidroksi-4-(3-hidroksi-4-metoksikarbonil-5-metilfenoksi)karbonil-5-metilfenil]-2-hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoat



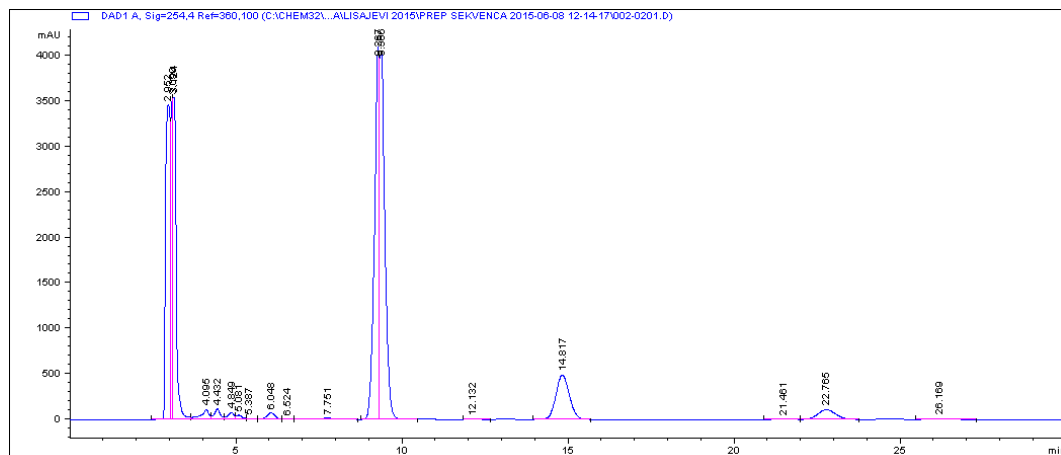
### Prilog 10. UV spektar atranorina

**Atranorin**,  $C_{19}H_{18}O_8$  (Mw 374,3 g/mol), (3-Hidroksi-4-metoksikarbonil-2,5-dimetilfenil)-3-formil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat

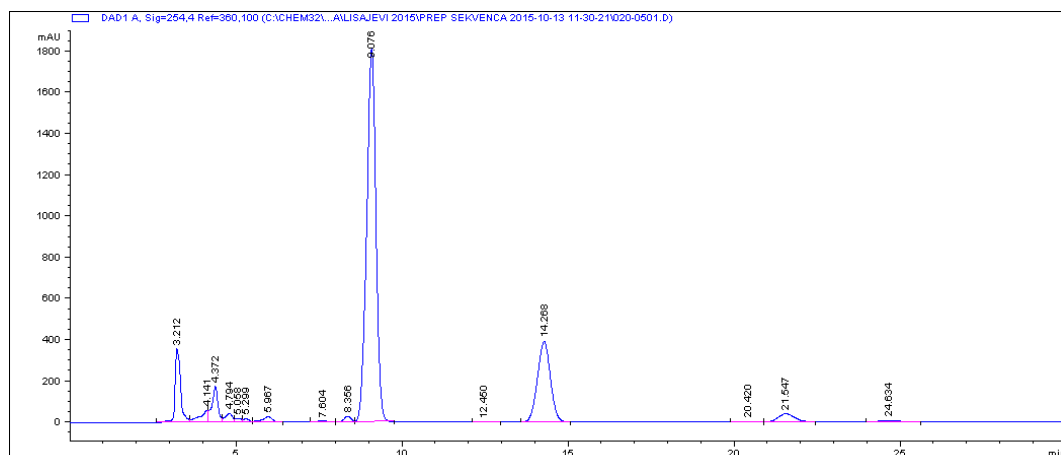


## HPLC hromatogrami

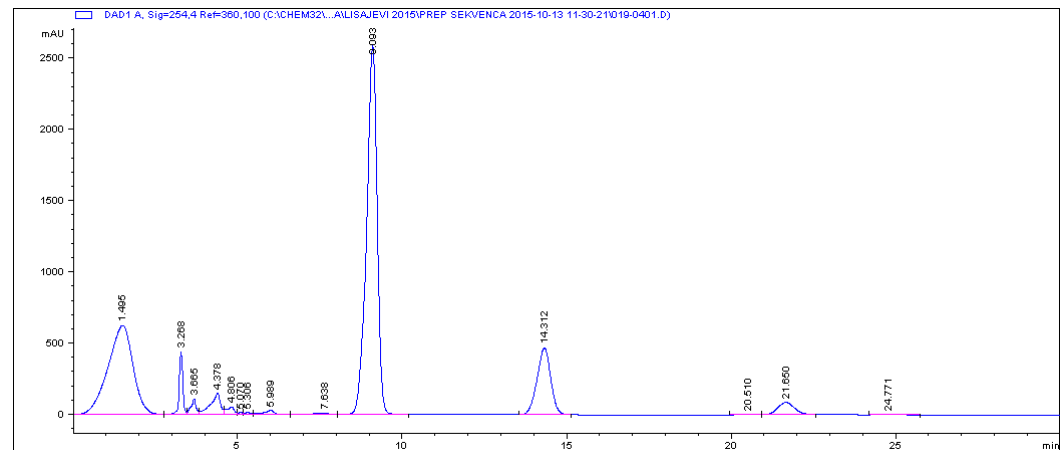
### Prilog 11. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *R. capitata*



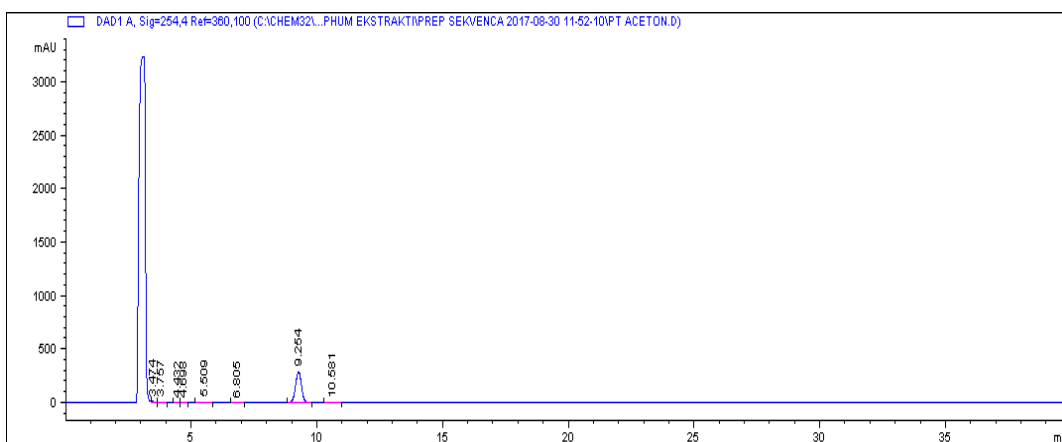
### Prilog 12. HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta lišaja *R. capitata*



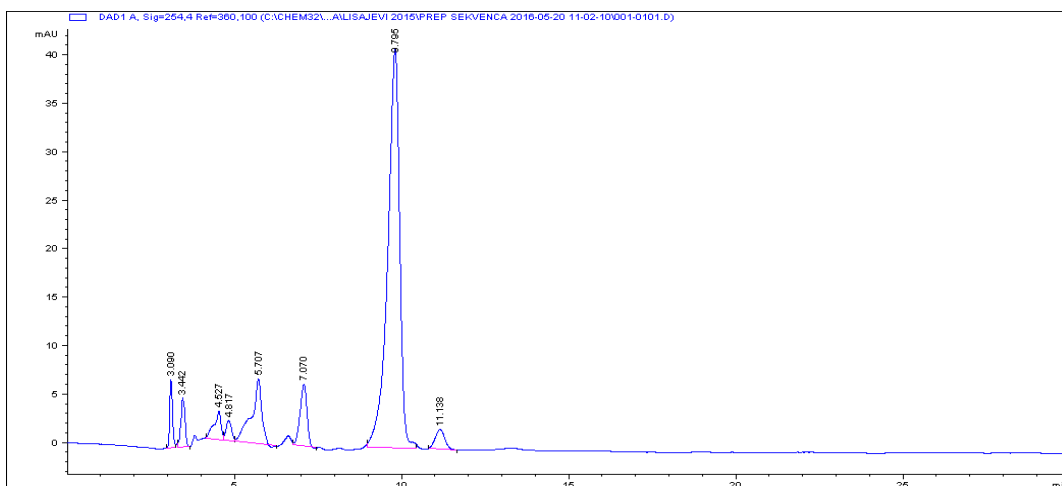
### Prilog 13. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta lišaja *R. capitata*



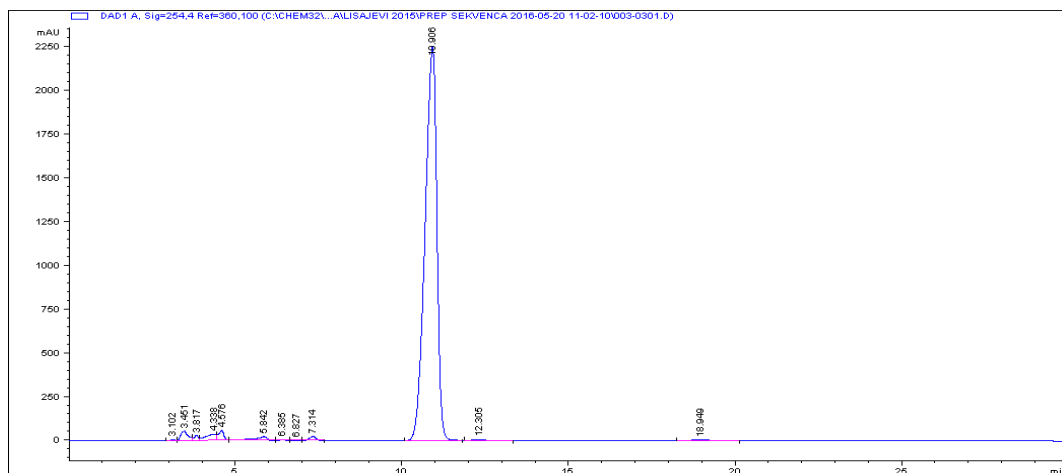
### Prilog 14. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*



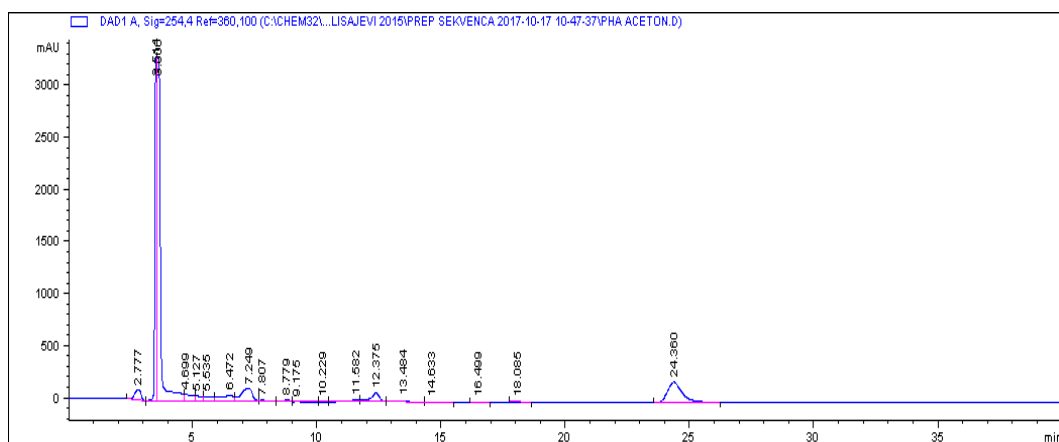
### Prilog 15. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*



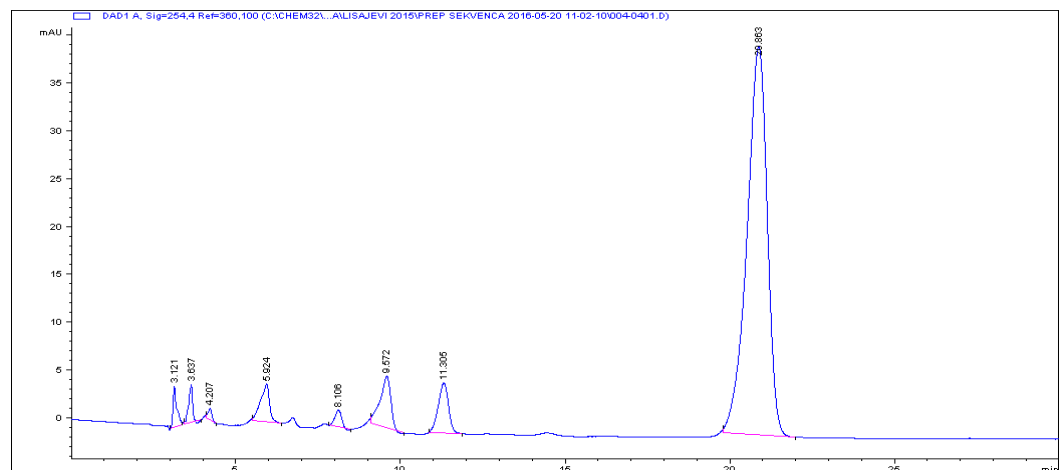
### Prilog 16. HPLC hromatogram dihlormetanskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis*



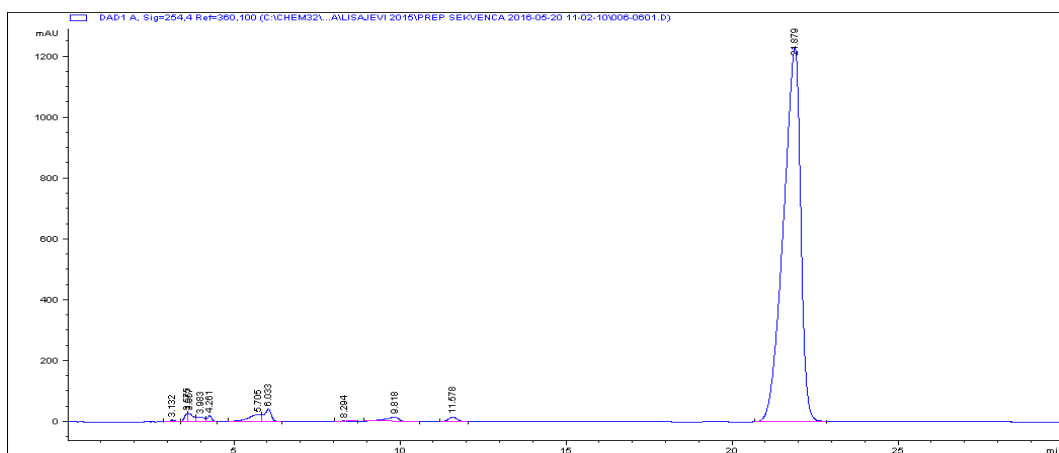
### Prilog 17. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*



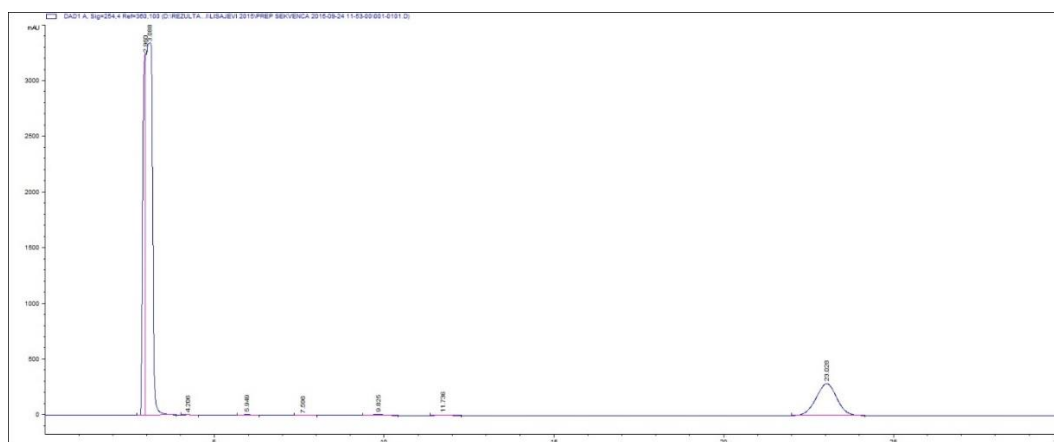
### Prilog 18. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*



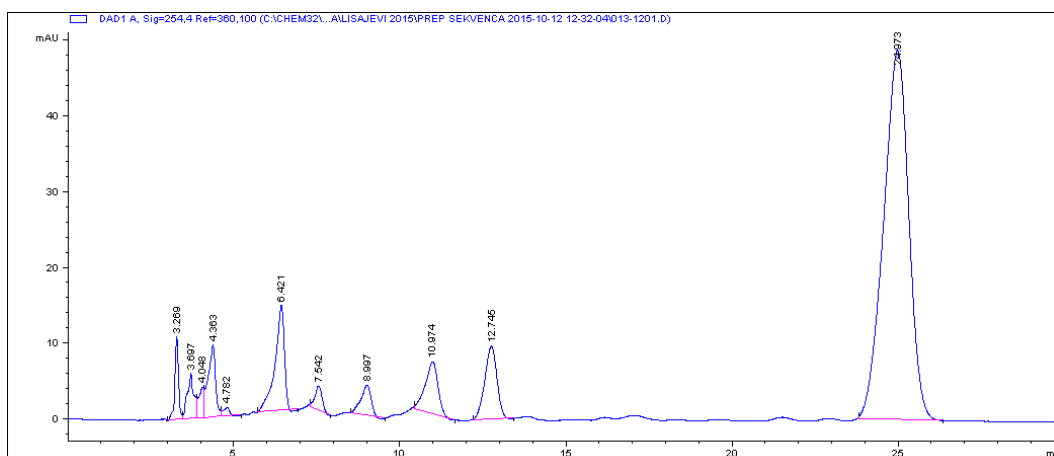
### Prilog 19. HPLC hromatogram dihlormetanskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis*



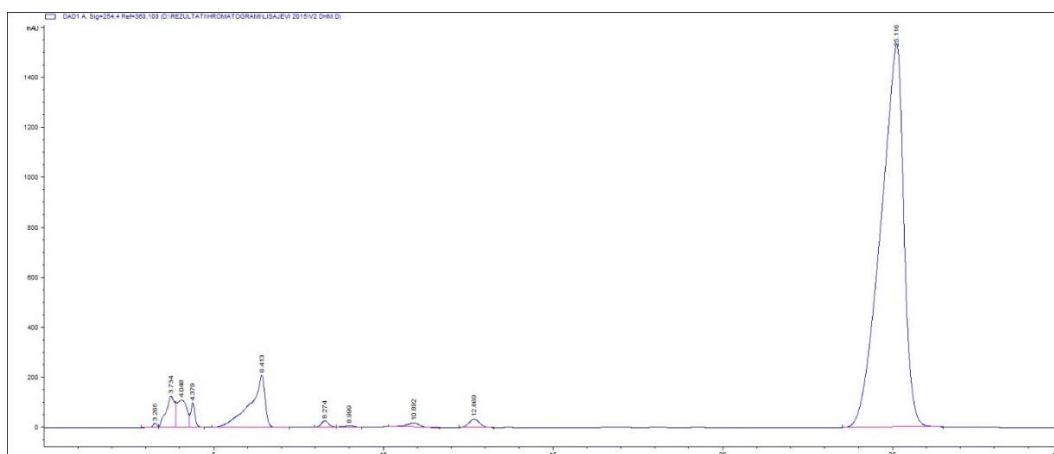
## Prilog 20. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*



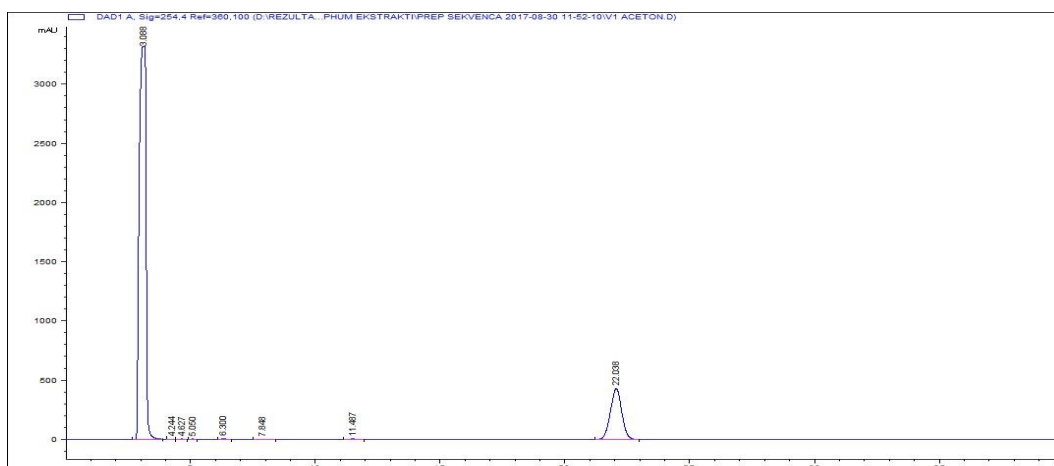
## Prilog 21. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*



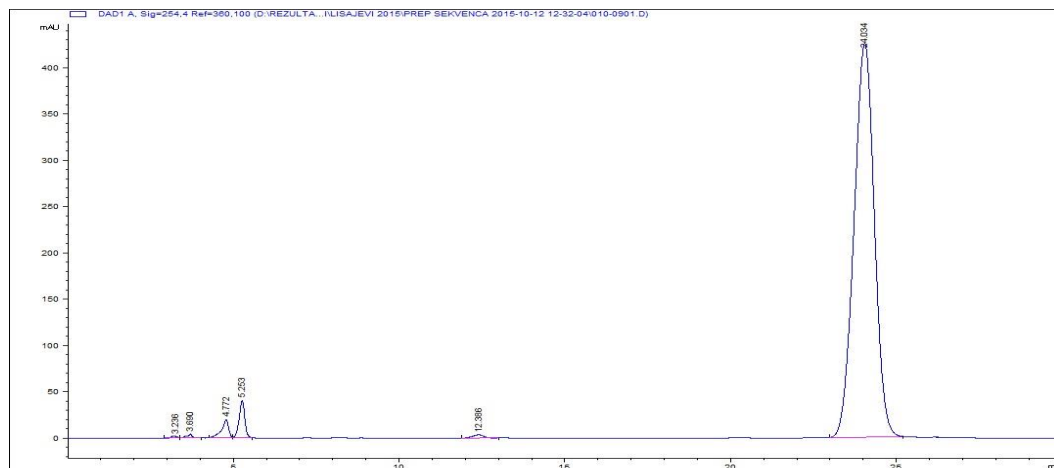
## Prilog 22. HPLC hromatogram dihlormetanskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis*



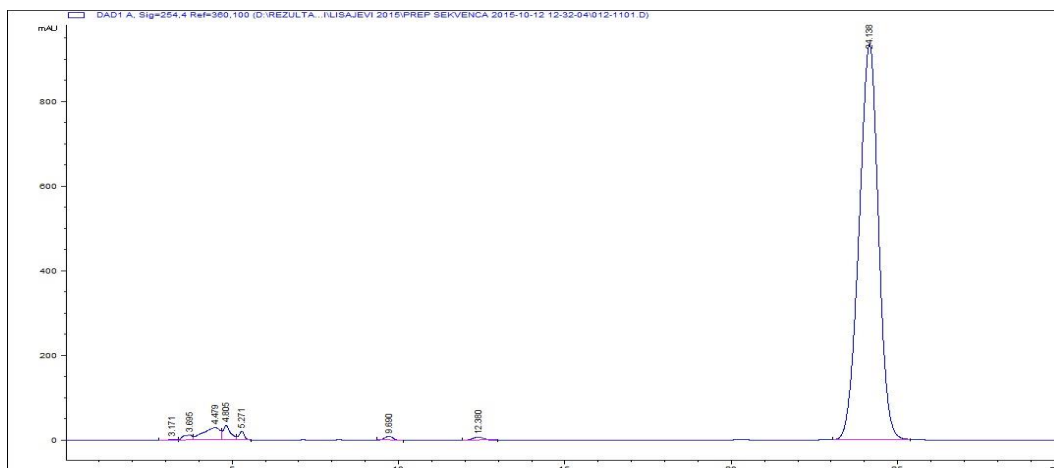
### Prilog 23. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*



### Prilog 24. HPLC hromatogram etarskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*



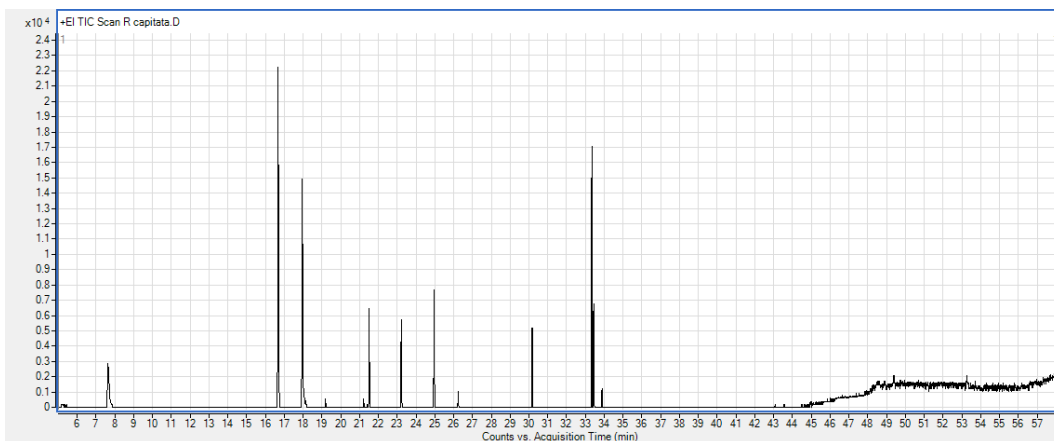
### Prilog 25. HPLC hromatogram dihlormetanskog talusa lišaja *C. rangiformis*



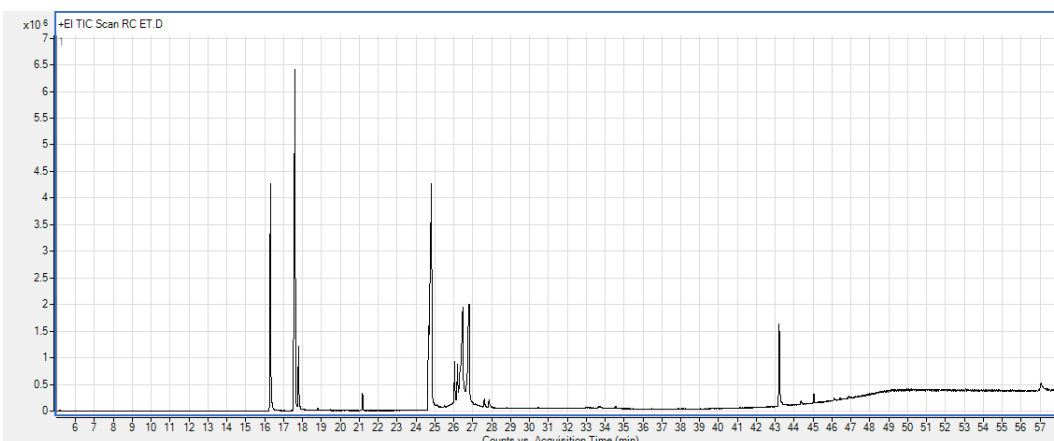


## GC-MS hromatogrami

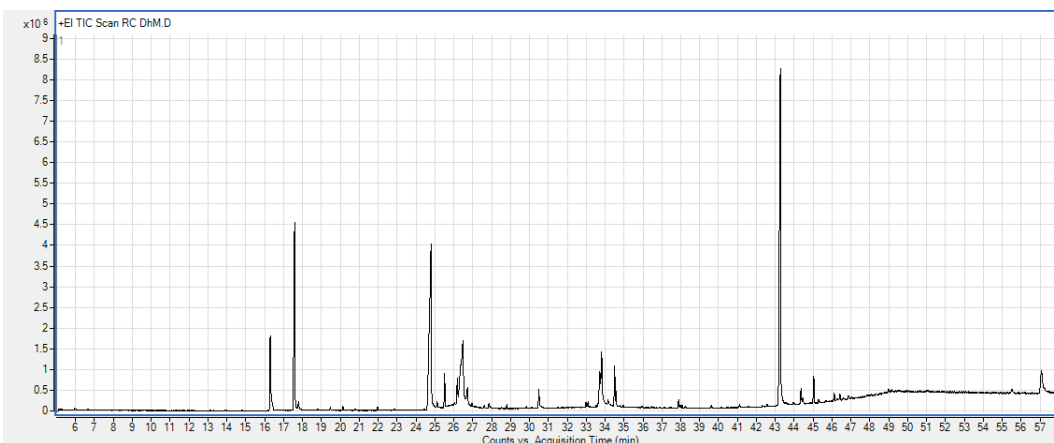
### Prilog 26. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *R. capitata*



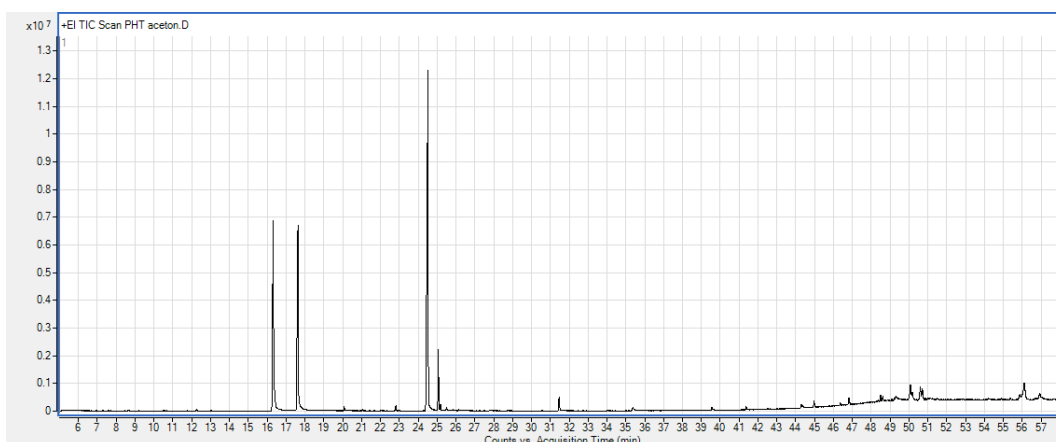
### Prilog 27. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta lišaja *R. capitata*



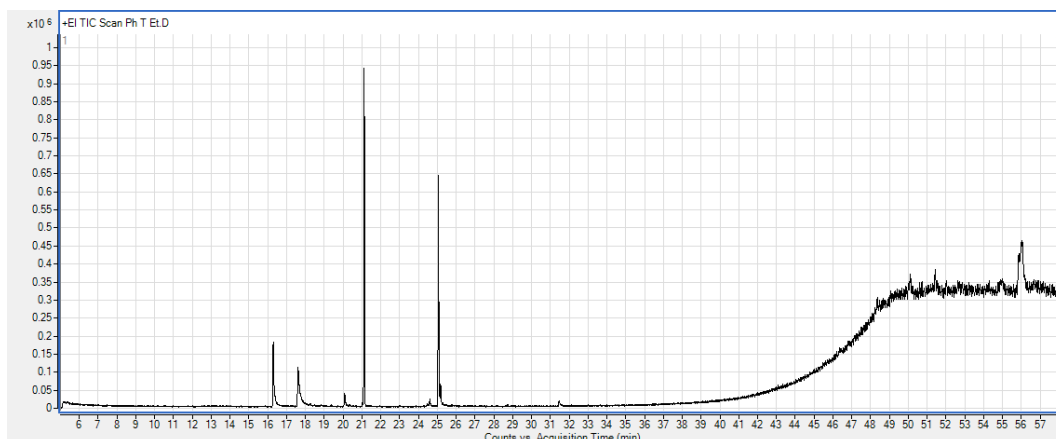
### Prilog 28. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta lišaja *R. capitata*



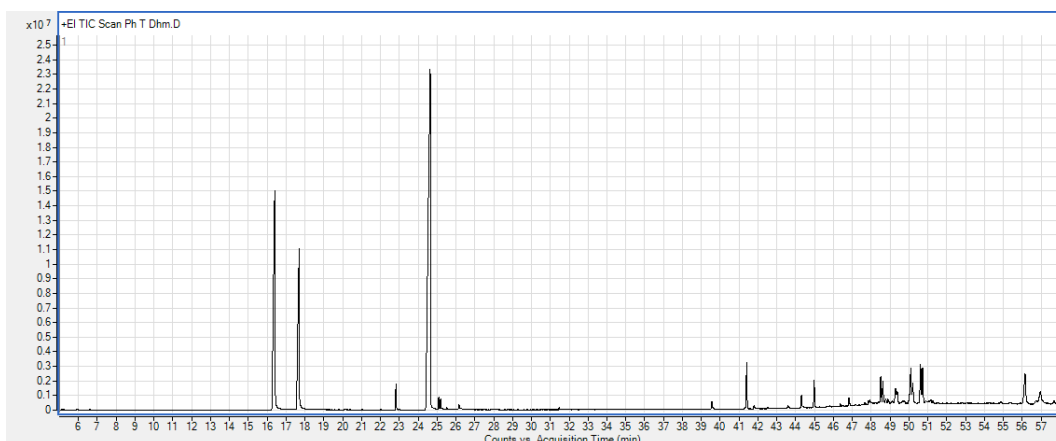
**Prilog 29. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis***



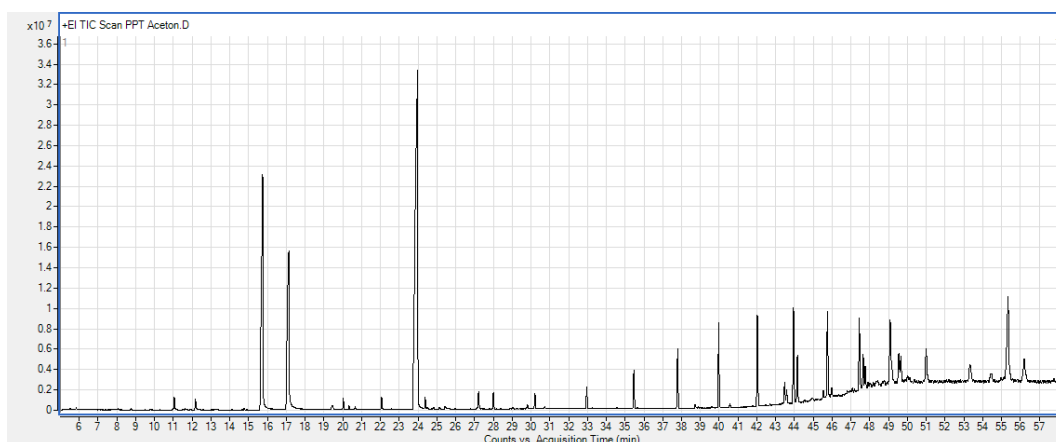
**Prilog 30. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis***



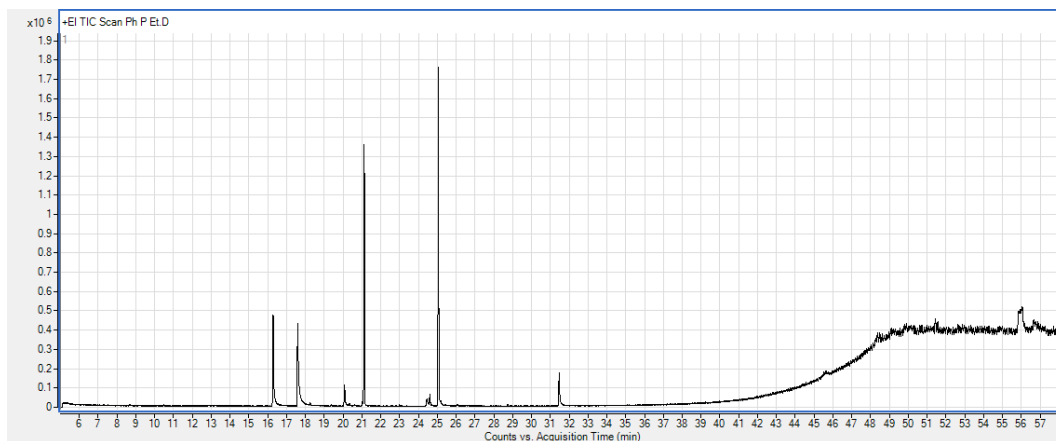
**Prilog 31. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta talusa lišaja *P. horizontalis***



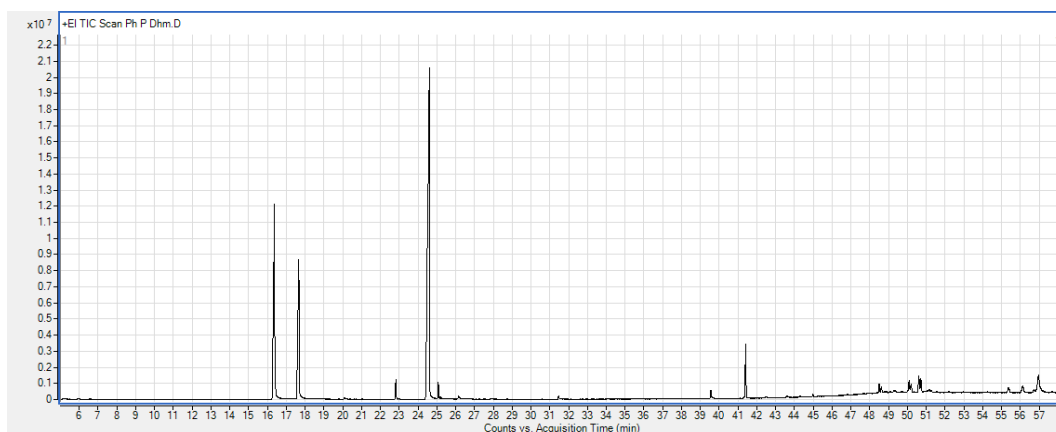
**Prilog 32. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis***



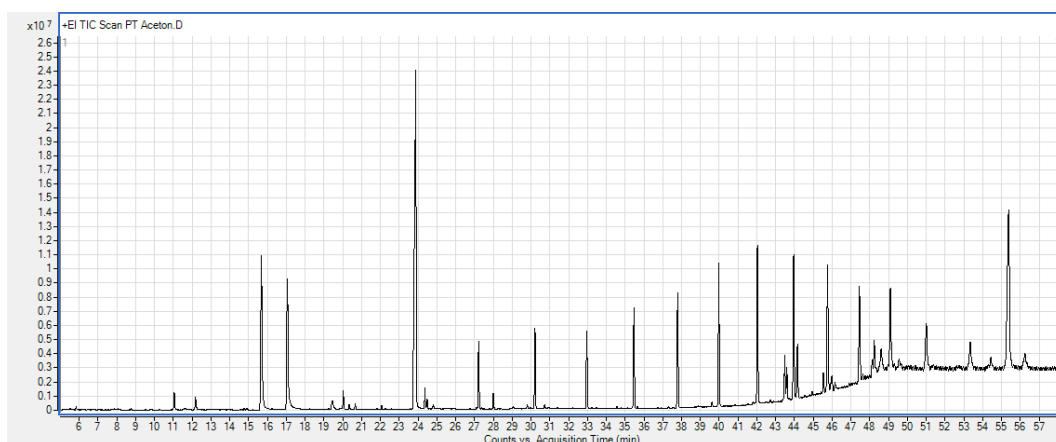
**Prilog 33. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis***



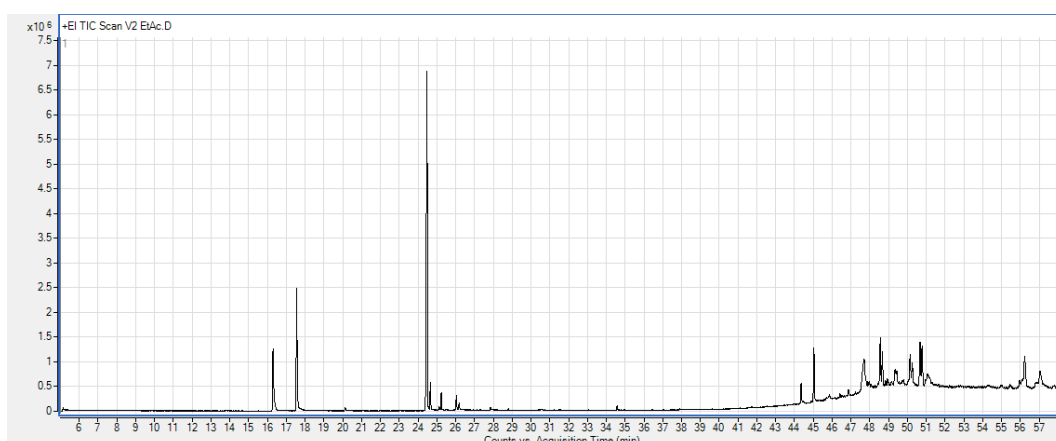
**Prilog 34. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta apotecija lišaja *P. horizontalis***



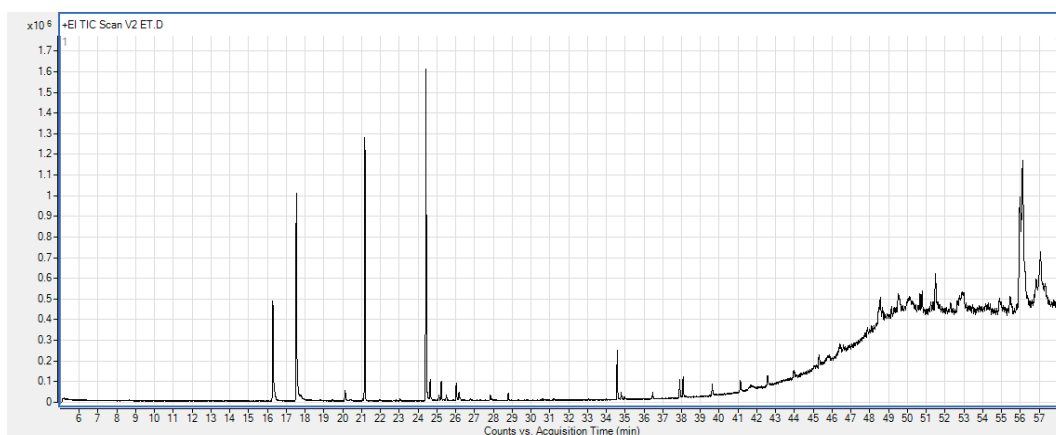
**Prilog 35. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis***



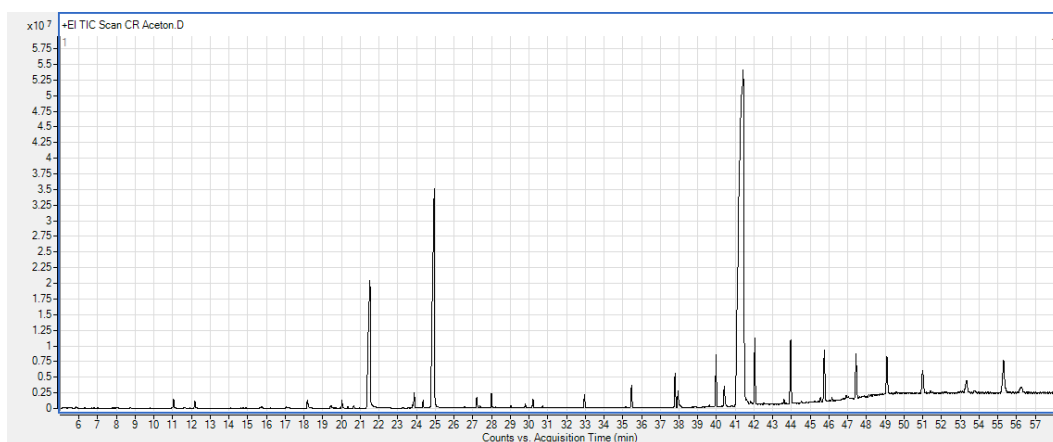
**Prilog 36. GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis***



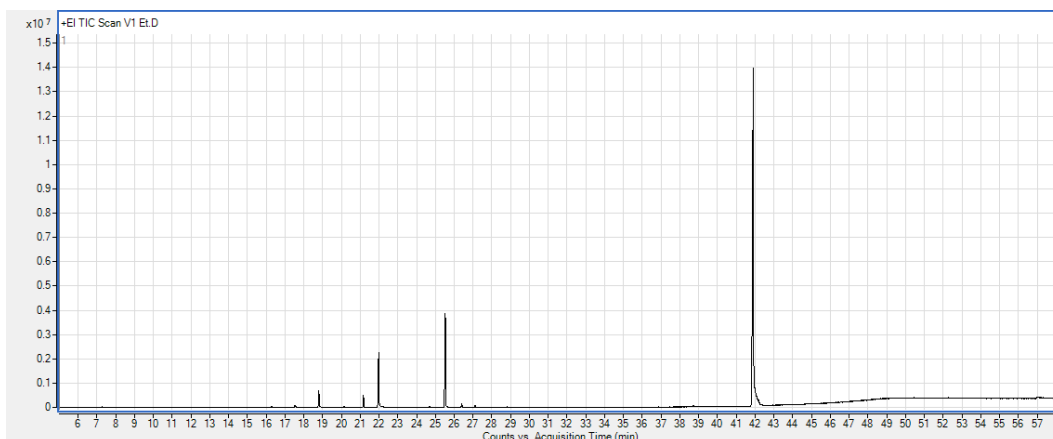
**Prilog 37. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta celokupnog lišaja *P. horizontalis***



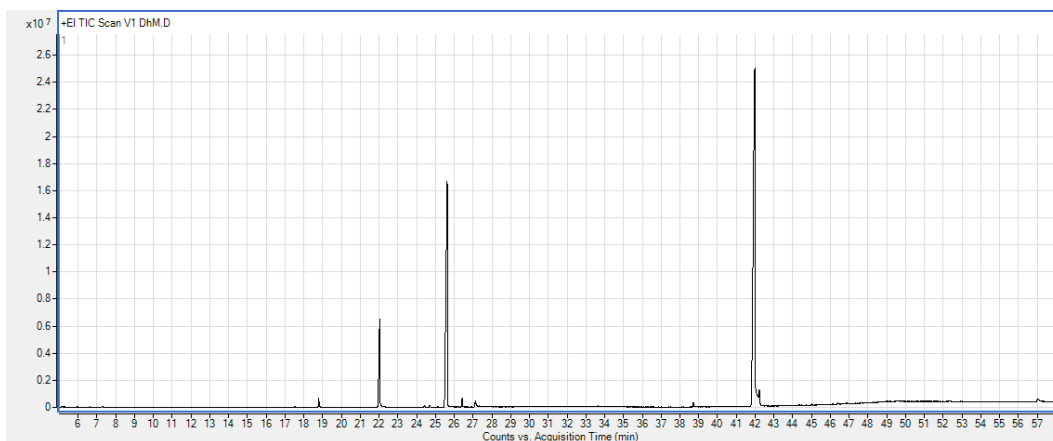
### Prilog 38. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*



### Prilog 39. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*

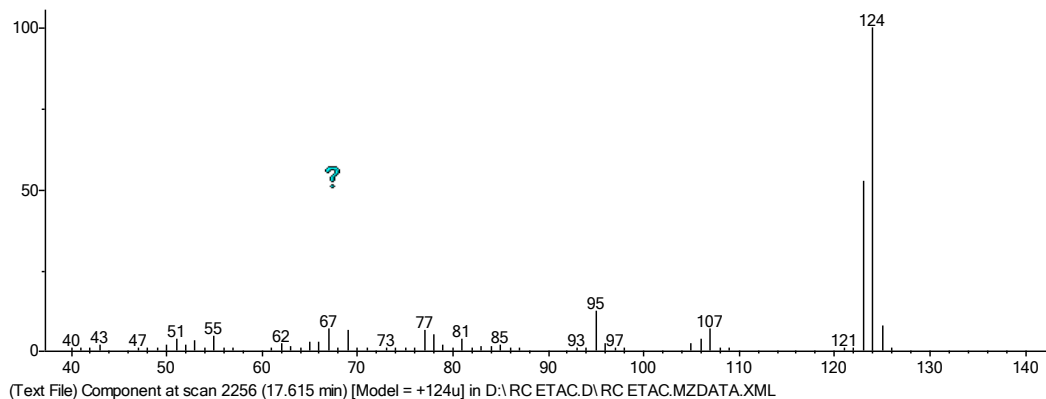


### Prilog 40. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta lišaja *C. rangiformis*

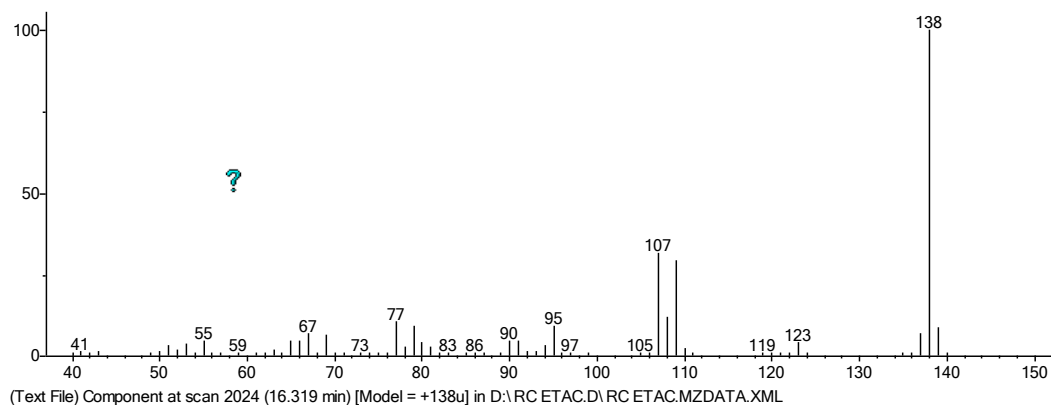


## Maseni spektri

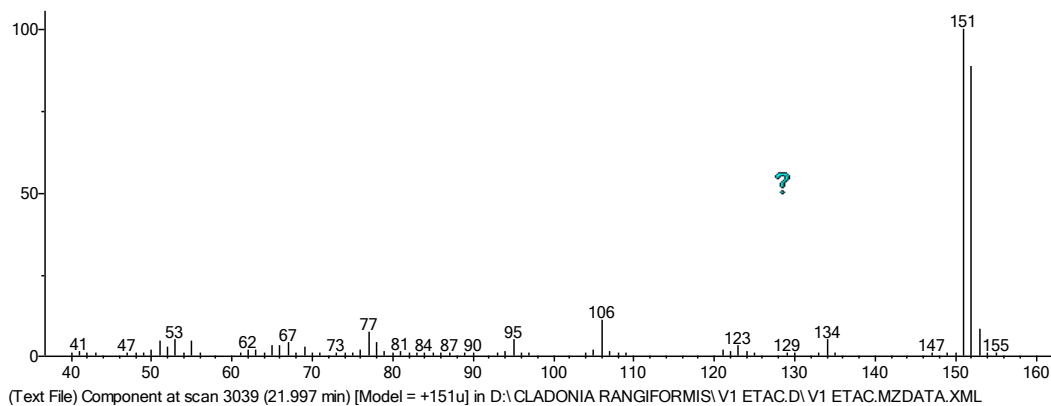
### Prilog 41. (EI)MS spektar orcinola



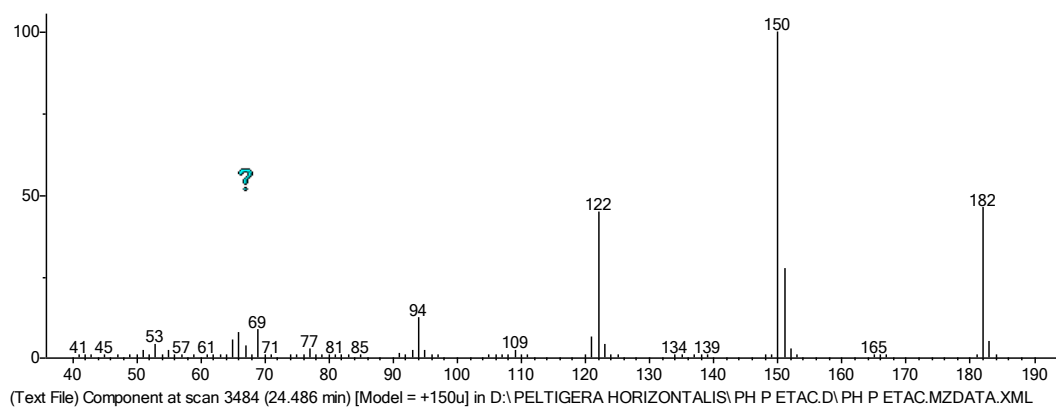
### Prilog 42. (EI)MS spektar orcinol-monometil-etra



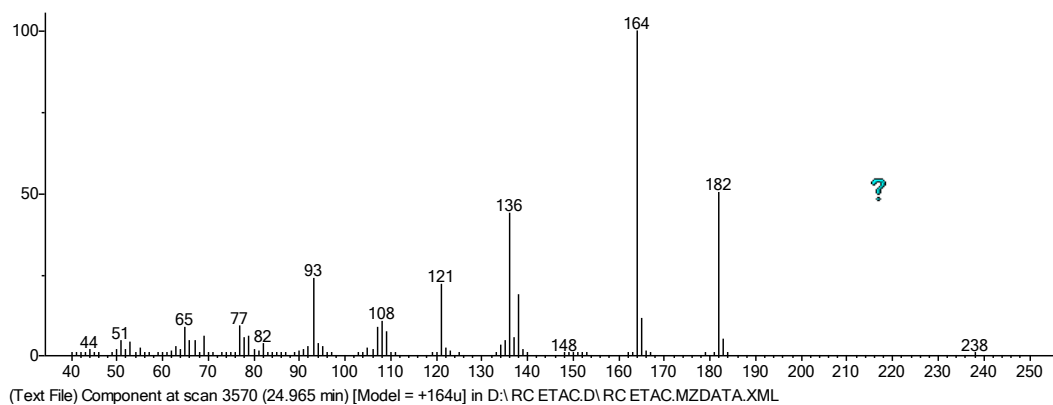
### Prilog 43. (EI)MS spektar atranola



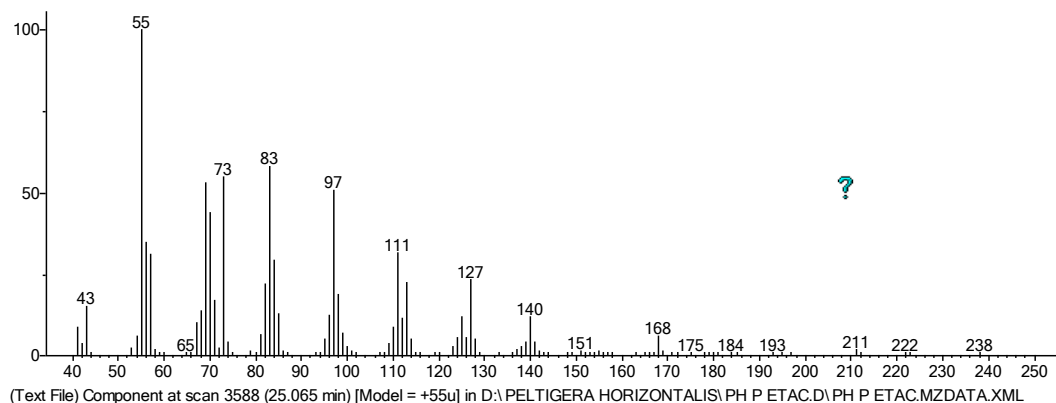
#### Prilog 44. (EI)MS spektar metil-orselinata



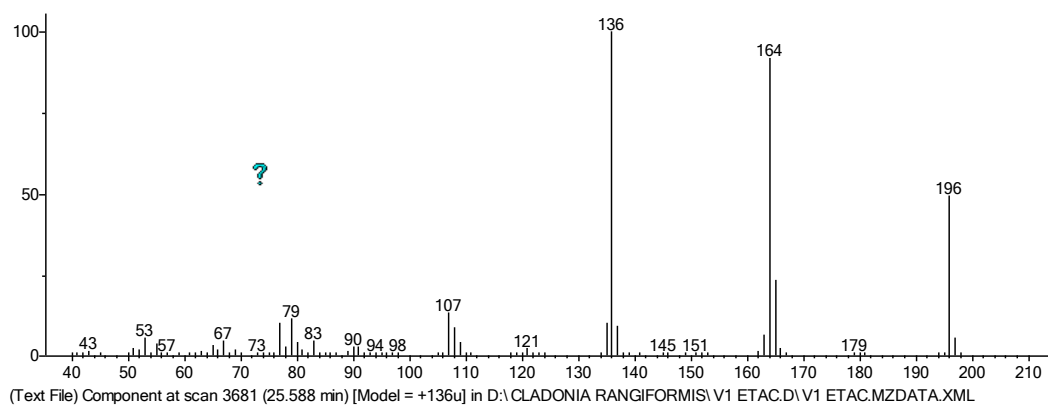
#### Prilog 45. (EI)MS spektar everninične kiseline



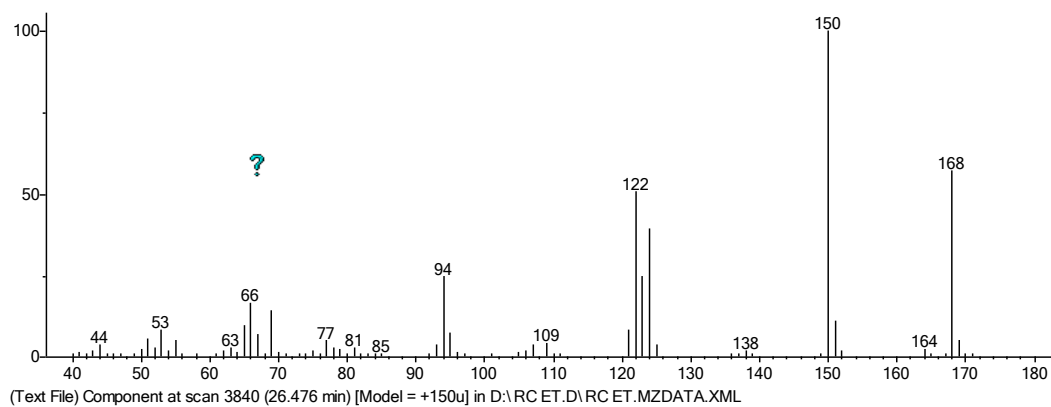
#### Prilog 46. (EI)MS spektar lauril-akrilata



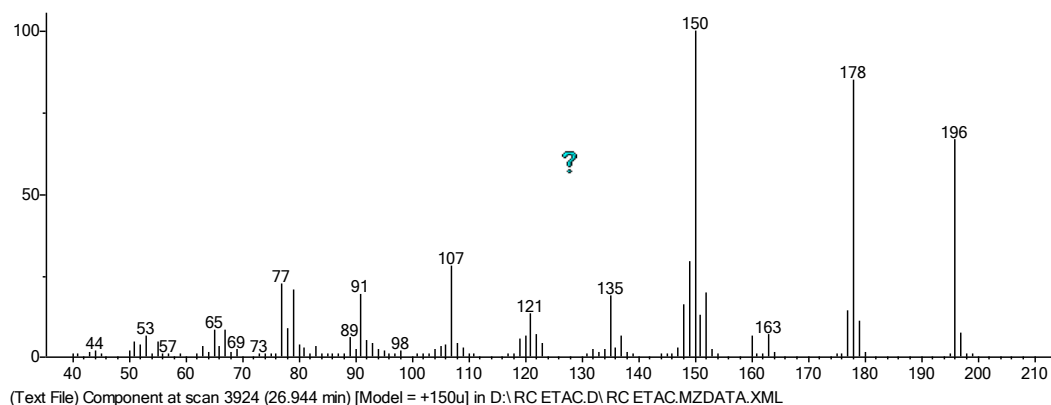
### Prilog 47. (EI)MS spektar atrarične kiseline



### Prilog 48. (EI)MS spektar 3-metilorselinske kiseline

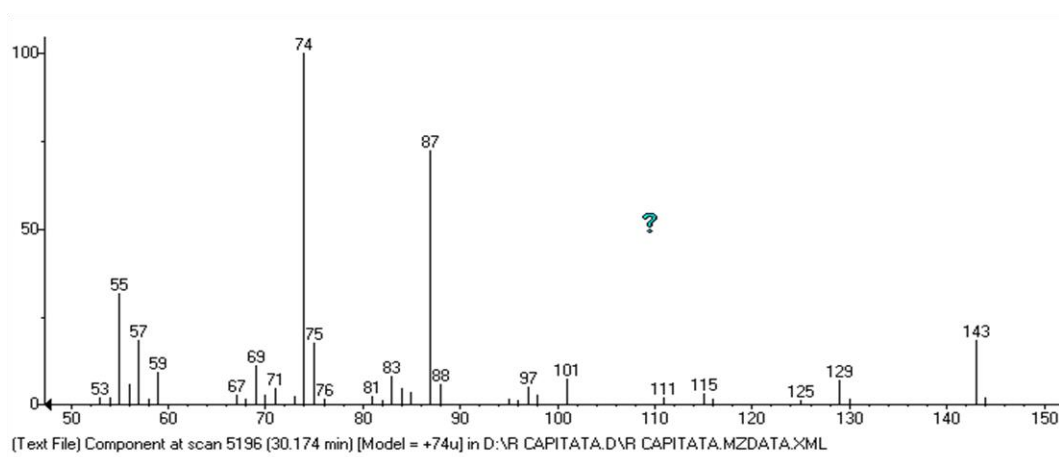


### Prilog 49. (EI)MS spektar 2-hidroksi-4-metoksi-3,5,6-trimetilbenzoeve kiseline

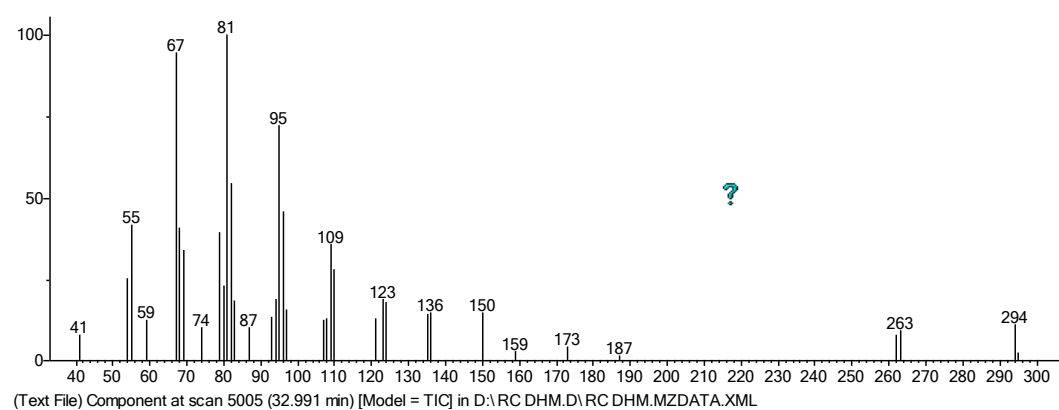




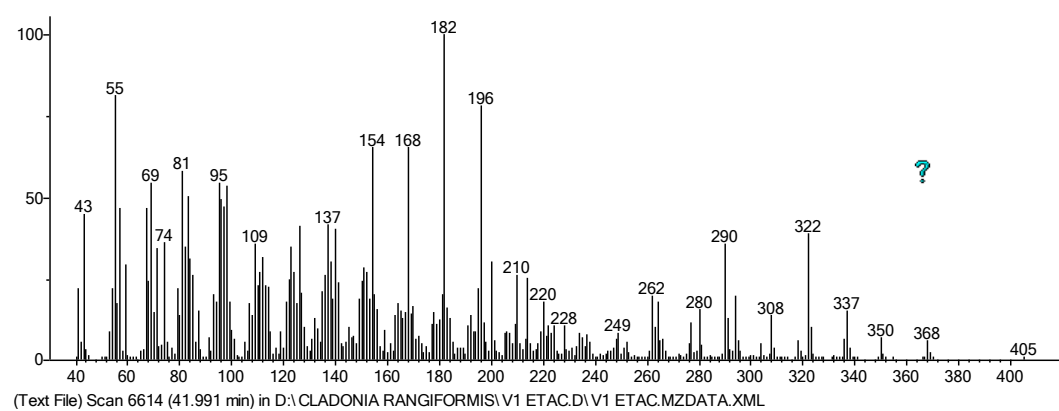
### Prilog 50. (EI)MS spektar metil-palmitata



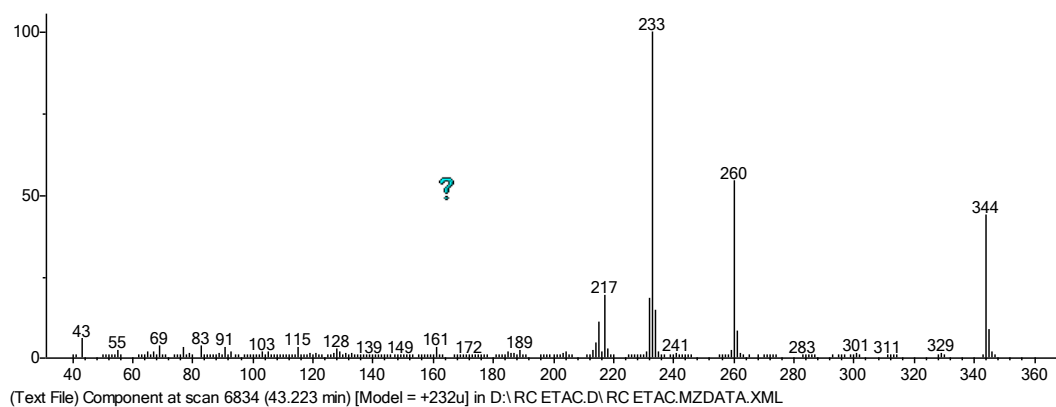
### Prilog 51. (EI)MS spektar metil-linoleata



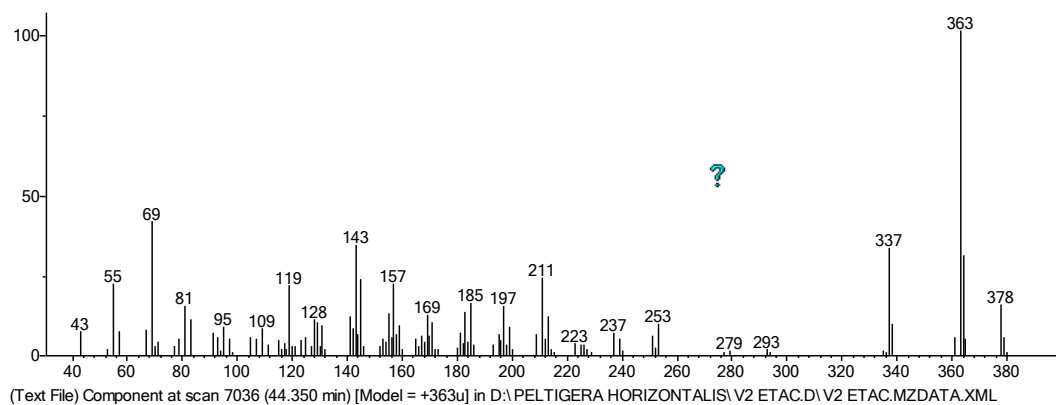
### Prilog 52. (EI)MS spektar rangiformne kiseline



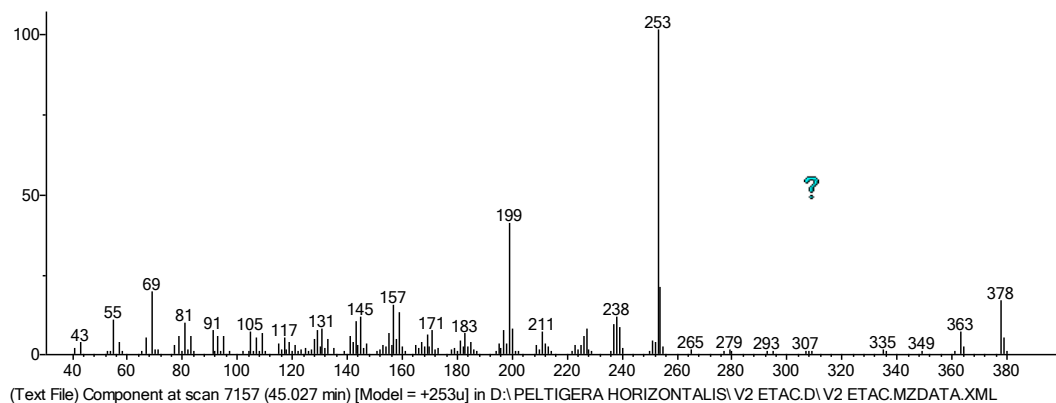
### Prilog 53. (EI)MS spektar usninske kiseline



### Prilog 54. (EI)MS spektar sterola 1



### Prilog 55. (EI)MS spektar sterola 2



## 7. BIOGRAFIJA

Ivana S. Dimitrijević (devojačko Zrnzević) rođena je 21.08.1988. u Kraljevu. Osnovnu školu pohađala je u Prizrenu i Vrnjačkoj Banji. Gimnaziju u Vrnjačkoj Banji završila je sa odličnim uspehom 2007. godine.

Osnovne akademske studije upisala je 2007. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, na Departmanu za hemiju, a iste završila 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,55 i stekla zvanje Hemičar. Diplomске akademske studije (smer primenjena hemija) završila je u roku, sa prosečnom ocenom 9,42. Odbranila je master rad sa ocenom 10, na katedri za Organsku i biohemiju na temu “Izolovanje konstituenata acetonskog ekstrakta lišaja *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale“ i stekla zvanje Master hemičar. Tokom diplomskih akademskih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Doktorske akademske studije upisala je 2012. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, na Departmanu za hemiju, pod mentorstvom prof. dr Gordane Stojanović. Od maja 2013. godine angažovana je kao istraživač-pripravnik, a od aprila 2017. godine kao istraživač-saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, pod nazivom “Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena”, evidencioni broj OI 172047. Od 2020. godine je angažovana na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu kao istraživač-saradnik na osnovu ugovora o finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO, broj 451-03-9/2021-14/200124.

U toku doktorskih akademskih studija bila je anagažovana u svojstvu saradnika u nastavi na predmetima osnovnih i master studija: Hemija primarnih biomolekula, Dinamička biohemija i Eksperimentalna organska hemija na Departmanu za hemiju i Organska hemija na Departmanu za biologiju i ekologiju.

Učestvovala je na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu i kao autor ili koautor publikovala je rezultate istraživanja u časopisima međunarodnog i nacionalnog značaja. U svom istraživačkom radu objavila je: 1 rad u vrhunskom međunarodnom časopisu, 3 rada u istaknutim međunarodnim časopisima, 2 rada u međunarodnim časopisima, 4 rada u časopisima nacionalnog značaja i 7 saopštenja sa naučnih skupova međunarodnog i nacionalnog značaja. Radovi iz doktorata su označeni zvezdicom.

## 8. BIBLIOGRAFIJA

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu kategorije **M21**:

- **Zrnzević Ivana**, Stanković Miroslava, Stankov-Jovanović Vesna, Mitić Violeta, Đorđević Aleksandra, Zlatanović Ivana, Stojanović Gordana. (2017). *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. acetone extract: HPLC analysis, genotoxicity, cholinesterase, antioxidant and antibacterial activity. EXCLI Journal, 16: 679-687. \*  
([https://www.excli.de/vol16/Stojanovic\\_11052017\\_proof.pdf](https://www.excli.de/vol16/Stojanovic_11052017_proof.pdf))

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima kategorije **M22**:

- **Zrnzević Ivana**, Jovanović Olga, Zlatanović Ivana, Stojanović Igor, Petrović Goran, Stojanović Gordana. (2017). Constituents of *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. Extracts. Natural Product Research, 31 (7): 857-860. \*  
(<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2016.1272112>)
- Stojanović Gordana, **Zrnzević Ivana**, Zlatanović Ivana, Stanković Miroslava, Stankov-Jovanović Vesna, Mitić Violeta, Đorđević Aleksandra. (2020). Chemical profile and biological activities of *Peltigera horizontalis* (Hudson) Baumg. thallus and apothecia extracts, Natural Product Research, 34 (4): 549-552. \*  
(<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2018.1489386>)
- Stojanović Gordana, Zlatanović Ivana, **Zrnzević Ivana**, Stanković Miroslava, Stankov-Jovanović Vesna, Zlatković Bojan. (2017). *Hypogymnia tubulosa* extracts: chemical profile and biological activities. Natural Product Research, 32 (22): 2735-2739.  
(<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2017.1375926>)

Radovi u međunarodnim časopisima kategorije **M23**:

- Zlatanović Ivana, Stanković Miroslava, Stankov-Jovanović Vesna, Mitić Violeta, **Zrnzević Ivana**, Đorđević Aleksandra, Stojanović Gordana. (2017). Biological activities of *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey acetone extract. Journal of Serbian Chemical Society, 82 (2): 141-150.  
(<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0352-51391700014Z#.YNCewWgzZPY>)
- Zlatanović Ivana, **Zrnzević Ivana**, Jovanović Olga, Stojanović Igor, Petrović Goran, Stojanović Gordana. (2017). Chemical Composition of *Umbilicaria crustulosa* and *U. cylindrica*. Natural Product Communications, 12 (7): 1105-1106.  
(<https://ezproxy.nb.rs:2173/doi/pdf/10.1177/1934578X1701200726>)

*Radovi u vrhunskim časopisima nacionalnog značaja kategorije M51:*

- **Zrnzević Ivana**, Zlatanović Ivana, Lazarević Jelena, Jovanović Olga, Stojanović Gordana. (2015). GC-MS analysis of *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl extract. *Facta Universitatis: Series Physics, Chemistry and Technology*, 13 (2): 91-97. \*
- Zlatanović Ivana, Petrović Goran, Jovanović Olga, **Zrnzević Ivana**, Stojanović Gordana. (2016). Isolation and identification of secondary metabolites of *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey. *Facta Universitatis: Series Physics, Chemistry and Technology*, 14 (2): 125-133.
- Stojanović Gordana, Jovanović Olga, Zlatković Bojan, Jovanović Snežana, **Zrnzević Ivana**, Ilić Marija. (2017). Chemical composition of volatiles obtained from fresh root of *Peucedanum longifolium* Waldst. & Kit. *Acta Medica Medianae*, 56 (1): 82-85.

*Rad u nacionalnom časopisu kategorije M53:*

- Stojanović Gordana, Jovanović Olga, Zlatković Bojan, Jovanović Snežana, **Zrnzević Ivana**, Ristić Novica. (2017). First insight into the chemical composition of essential oils and head space volatiles obtained from fresh leaves and flowers of *Peucedanum longifolium* Waldst. & Kit., *Biologica Nyssana*, 8 (1): 99-103.

*Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu M34:*

- **Zrnzević Ivana**, Jovanović Olga, Zlatanović Ivana, Stojanović Igor, Petrović Goran, Stojanović Gordana. Constituents of *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl extracts, 6<sup>th</sup> International Congress of Aromatic and Medicinal Plants CIPAM 2016, Coimbra (Portugal), 29. May – 1. June, 2016, 273.
- Stojanović Gordana, Jovanović Olga, Zlatković Bojan, Jovanović Snežana, **Zrnzević Ivana**, Ristić Novica. Chemical composition of essential oils and head space volatiles obtained from fresh leaves and flowers of *Peucedanum longifolium* Waldst. & Kit., 6<sup>th</sup> International Congress of Aromatic and Medicinal Plants CIPAM 2016, Coimbra (Portugal), 29. May – 1. June, 2016, 267.

*Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini M63:*

- Dimitrijević Vladimir, Anđelković Tatjana, Krstić Nenad, **Zrnzević Ivana**. Mogućnosti primene fitoremedijacije zemljišta zagađenog teškim metalima, Prvi naučni skup sa međunarodnim učešćem "Nastava i nauka u vremenu i prostoru", Leposavić, 6-7. mart, 2015, 1115-1131.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu **M64**:

- **Zrnzević Ivana**, Jovanović Olga. Chemical composition of *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale acetone extract, 2<sup>nd</sup> Conference of the Young Chemist of Serbia, Niš, 5-7. June, 2014, 138.
- **Zrnzević Ivana**, Zlatanović Ivana, Dimitrijević Vladimir, Stojanović Gordana. Biološka aktivnost sekundarnih metabolita lišaja, Prvi naučni skup sa međunarodnim učešćem "Nastava i nauka u vremenu i prostoru", Leposavić, 6-7. mart, 2015, 95.
- Zlatanović Ivana, **Zrnzević Ivana**, Jovanović Olga, Stojanović Igor, Petrović Goran, Stojanović Gordana. GC-MS profile of *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey and *Umbilicaria cylindrica* (L.) Duby extracts, 12<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., 16-19. June, 2016, 87.
- Stojanović Gordana, Jovanović Olga, Zlatković Bojan, Jovanović Snežana, **Zrnzević Ivana**, Ilić Marija. GC-MS profile of volatiles obtained from fresh root of *Peucedanum longifolium* Waldst. & Kit., 12<sup>th</sup> Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt., 16-19. June, 2016, 88.

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**Анализа хемијског састава и биолошке активности лишајева *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl., *Peltigera horizontalis* (Hudson) Baumg. и *Cladonia rangiformis* Hoffm.**

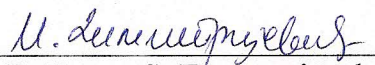
која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 05.07.2021.

Потпис аутора дисертације:

  
Др Ивана С. Димитријевић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**Анализа хемијског састава и биолошке активности лишајева *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl., *Peltigera horizontalis* (Hudson) Baumg. и *Cladonia rangiformis* Hoffm.**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 05.07.2021.

Потпис аутора дисертације:



Др Ивана С. Димитријевић



## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**Анализа хемијског састава и биолошке активности лишајева *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl., *Peltigera horizontalis* (Hudson) Baumg. и *Cladonia rangiformis* Hoffm.**


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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 05. 07. 2021.

Потпис аутора дисертације:



Др Ивана С. Димитријевић