



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Данијела Пецарски

**АНТИМИКРОБНО ДЕЈСТВО ЕТАРСКИХ УЉА
НЕКИХ ВРАСТА ФАМИЛИЈА *APIACEAE* И
LAMIACEAE НА БАКТЕРИЈЕ И ГЉИВИЦЕ
УЗРОЧНИКЕ ВУЛВО-ВАГИНАЛНИХ
ИНФЕКЦИЈА ЖЕНА У РЕПРОДУКТИВНОМ
ПЕРИОДУ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014. година

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ



THE MEDICAL FACULTY
UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

**АНТИМИКРОБНО ДЕЈСТВО ЕТАРСКИХ УЉА
НЕКИХ ВРАСТА ФАМИЛИЈА *APIACEAE* И
LAMIACEAE НА БАКТЕРИЈЕ И ГЉИВИЦЕ
УЗРОЧНИКЕ ВУЛВО-ВАГИНАЛНИХ
ИНФЕКЦИЈА ЖЕНА У РЕПРОДУКТИВНОМ
ПЕРИОДУ**

Докторска дисертација

Кандидат:

Данијела Пецарски

Ментор:

проф. др Слободан Јанковић

Крагујевац 2014.

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Данијела Пецарски
Датум и место рођења: 09.08.1973.Чачак
Садашње запослење: Висока здравствена школа струковних студија у Београду, Mella cosmetics d.o.o.
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: Антимикробно дејство етерских уља неких врста фамилија Ариасеае и Lamiaceae на бактерије и гљивице узрочнике вулво-вагиналних инфекција жена у репродуктивном периоду
Број страница: 161
Број слика: 50
Број библиографских података: 449
Установа и место где је рад израђен: Технолошко металуршки факултет, Катедра за биохемијско инжењерство и биотехнологије, Универзитет Београд
Научна област (УДК): Клиничка фармакологија
Ментор: Проф. др Слободан Јанковић
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме:
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Зорица Кнежевић Југовић-председник Проф. др Сузана Димитријевић Бранковић-члан Проф. др Мирјана Варјачић- члан
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Зорица Кнежевић Југовић-председник Проф. др Сузана Димитријевић Бранковић-члан Проф. др Мирјана Варјачић- члан
Комисија за оцену докторске дисертације: Проф. др Зорица Кнежевић Југовић-председник Проф. др Сузана Димитријевић Бранковић-члан Проф. др Мирјана Варјачић- члан
Комисија за одбрану докторске дисертације: Проф. др Зорица Кнежевић Југовић-председник Проф. др Сузана Димитријевић Бранковић-члан Проф. др Мирјана Варјачић- члан
Датум одбране дисертације:

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	7
2. ЦИЉ РАДА	10
3. ХИПОТЕЗА	11
4. ОПШТИ ДЕО	12
4.1. БАКТЕРИЈСКА ВАГИНОЗА	12
4.1.1. Вагинална микрофлора.....	12
4.1.1.1. Вагинални рН.....	13
4.1.2. Бактеријска вагиноза.....	14
4.1.2.1. Дијагноза БВ	15
4.1.2.2. Антибиотска терапија бактеријске вагинозе (БВ).....	16
4.2. АНТИБАКТЕРИЈСКИ ЛЕКОВИ	18
4.2.1. Бактерије	18
4.2.1.1. Грађа бактеријске ћелије.....	18
4.2.1.2. Фактори који утичу на раст и развој бактерија	21
4.2.1.3. Улога бакетрија у инфективном процесу	22
4.2.2. Антибактеријски лекови.....	23
4.2.2.1. Механизам деловања антибиотика за третирање бактеријских вагиноза (метронидазол и клиндамицин)	24
4.2.3. Отпорност микроорганизама на деловање антибиотика (резистенција).....	26
4.2.3.1. Врсте резистенције	26
4.2.3.2. Резистенција на метронидазол и клиндамицин	29
4.3. ЕТАРСКА УЉА.....	33
4.3.1. Биљке као потенцијални извор антимикробних материја.....	33
4.3.1.1. Жалфија (<i>Salvia officinalis</i>).....	38
4.3.1.2. Тимијан (<i>Thymus vulgaris</i>).....	39
4.3.1.3. Оригано (<i>Origanum vulgare</i>)	40
4.3.1.4. Морач (<i>Foeniculum vulgare</i>).....	41
4.3.1.5. Ким (<i>Carum Carvi</i>).....	41
4.3.1.6. Коријандер (<i>Coriandrum sativum</i>),.....	41
4.3.2. Антибактеријске ароматичне биљне супстнце.....	42
4.3.3. Хемијска анализа етарских уља.....	43
4.3.3.1. Састав етарских уља.....	44

4.3.3.2. Антимикробна активност етарских уља.....	48
4.3.4. Механизам антимикробног деловања етарских уља	53
4.3.4.1. <i>In vitro</i> тестови антимикробне активности.....	56
4.4. <i>DRUG DELIVERY SYSTEM</i> ЗА ВАГИНАЛНУ ПРИМЕНУ	58
4.4.1. Анатомија и физиологија вагине која условљава вагинални <i>drug delivery</i>	58
4.4.1.1. Вагинална апсорпција	59
4.4.2. <i>Drug Delivery</i> системи за вагиналну примену	59
4.4.3. Мукоадхезивни полимери са аспекта вагиналне примене лека.....	60
4.4.3.1. Хитозан	62
4.4.3.2. Хитозан као носач биоактивних супстанци за вагиналну примену	63
4.4.4. Системи испоруке лека на бази микро / нано хитозанских честица	65
5. МАТЕРИЈАЛИ.....	70
5.1. Материјал за микробиолошку и хемијску анализу	70
5.1.1. Испитивана етарска уља	70
5.1.2. Коришћене културе микроорганизама	70
5.1.3. Коришћене подлоге.....	71
5.2. Материјали за прављење хитозанских микрочестица	71
5.2.1. Материјал потербан а прављење водене фазе:	71
5.2.2. Материјал потребан за прављење уљане фазе:.....	71
5.2.3. Опрема која се користи:.....	71
6. МЕТОДЕ.....	72
6.1. Хемијска анализа	72
6.1.1. Припрема етарских уља за GC/MS анализу.....	72
6.2. Микробиолошка испитивања	73
6.2.1. Испитивања антимикробног дејства етарских уља.....	73
6.3. Методе израде хитозанских честица са етарским уљем тимијана	75
6.3.1. Добијање микрочестица.....	75
6.3.2. Испирање честица и чување.....	77
6.3.3. Праћење отпуштања биоактивне супстанце <i>in vitro</i> (узорковање).....	77
6.3.4. Кинетика отпуштања полифенола	78
6.3.4.1. Одређивање укупних полифенола – FC метода	78
6.3.4.2. Израда баждарне криве за FC методу.....	78
6.3.4.3. Припрема узорака за FC методу.....	79
6.3.4.4. Поступак мерења након узимања узорака из чашица.....	80

6.3.5. Одређивање степена инкапсулације тимијана.....	80
6.3.6. Поступак одређивања степена инкапсулације и запремине заосталог тимијана у честицама	80
6.3.7. Карактеризација микрочестица.....	82
7. РЕЗУЛТАТИ	83
7.1 Резултати хемијске анализе етарских уља	83
7.1.1. Резултати одредјивања хемијског сатава етарског уља еукалиптуса.....	85
7.1.2. Резултати одредјивања хемијског сатава етарског уља кима	87
7.1.3. Резултати одређивања хемијског сатава етарског уља кориандера	89
7.1.4. Резултати одређивања хемијског сатава етарског уља морача.....	91
7.1.5. Резултати одређивања хемијског сатава етарског уља оригана	93
7.1.6. Резултати одређивања хемијског сатава етарског уља жалфије.....	96
7.1.7. Резултати одређивања хемијског сатава етарског уља тимијана	98
7.3. Резултати израде хитозанских честица са етарским уљем тимијана	100
7.4. Одређивање степена инкапсулације и запремине заосталог тимијана у честицама	101
7.5. Кинетика отпуштања биоактивне компоненте (полифенола) из микрочестица	104
7.5.1. Кинетика отпуштања полифенола - FC метода.....	104
7.6. Карактеризација микрочестица.....	107
7.6.1. Одређивање величине честица.....	107
7.7. Резултати антимикробног дејства етарских уља применом методе дифузије у бунарчићима	110
7.8. Одредјивање МИС вредности.....	113
7.8.1. Кинетика раста <i>E. coli</i> у присуству етарских уља и одређивање МИС вредности	113
7.8.2. Кинетика раста <i>E. faecalis</i> у присуству етарских уља и одређивање МИС вредности	115
7.8.3. Кинетика раста <i>S. aureus</i> у присуству етарских уља и одређивање МИС вредности	116
7.8.4. Кинетика раста <i>C. albicans</i> у присуству етарских уља и одређивање МИС вредности	117
8. ДИСКУСИЈА	118

8.1. Хемијски састав етарских уља	118
8.2. Однос хемијског састава и антимикробне активности етарских уља фамилије <i>Lamiaceae</i> и <i>Apiaceae</i>	119
8.2. Одређивање степена инкапсулације и кинетике отпуштања тимијана из микрочестица	123
8.3. Карактеризација микрочестица	123
8.4. Антимикробно дејство етарских уља	124
9. ЗАКЉУЧАК	129
10. ЛИТЕРАТУРА	133

1. УВОД

Откриће антибиотика као “магичног” лека који је спасио милионе живота након првог светског рата представља преокрет у савременој медицини. Међутим, данас се тај појам “магичног” лека веома често оспорава, јер су ситуације као неуспела терапија, резистениција или толеранција на примењени антибиотик веома честе појаве. Бактеријска резистентност на примењене антибиотике се све више повећава и представља глобални здравствени проблем. Отпорност бактерија развија се различитим механизмима као што су стварање бактеријских ензима који делују на молекуле антибиотика, промена структуре рецептора ћелијске мембране који транспортују антибиотике у ћелију, активација протеинских пумпи које избацују антибиотике итд. Коначна резистенција се испољава генетским променама (мутацијама) микробне популације која се даље шири углавном преносом фактора резистенције процесима коњугације, трансформације и трансдукције, на друге до тада нерезистентне бактерије [1].

Услед доказане резистенције на антибиотике јавља се све веће интересовање за изналажење нових, алтернативних биљних препарата који је ће имати антимикубно дејство, што би било од нарочитог значаја у гинекологији. Идеално би било да ови природни препарати имају широк спектар деловања против великог броја патогених микроорганизама, да се лако производе и да нису склони индуковању резистентности.

Посебно место имају секундарни метаболити биљака, а највише етарска уља ароматичних биљака. Снажно антибактеријско дејство етарских уља могло би да буде пресудно у регулисању нормалне вагиналне микрофлоре жене у репродуктивном периоду. Вагинална флора здраве жене у репродуктивном периоду, доминантно садржи бактерија рода *Lactobacillus*, а у мањем броју и анаероб *Gardnerella vaginalis* и понекад *Mycoplasma hominis* и *Mobiluncus* које имају заштитну улогу и спречавају инфекције урогениталног тракта и других патолошких стања [2]. Оне продукцијом различитих једињења: водоник пероксид (H_2O_2), који има токсично дејство на друге организме и спречава њихово насељавање у вагини; млечна киселина која одржава киселост средине ($pH < 4,5$) и бактериоцини (антимикубни пептиди) спречавају раст потенцијалних патогена [3]. Већина бактерицина је изолована из врста *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus fermentum*, па се ове врсте могу користити и као потенцијални пробиотици у терапији инфекција уринарног тракта и вагине [4]. Поред тога врста рода *Lactobacillus* формирања биофилм и адхерирају са епителним ћелијама вагине чиме се спречава колонизација патогена [5]. Међутим, у стањима дуготрајних гениталних инфекција, смањеног имунолошког одговора организма, трудноће као стања физиолошке имунодефицијенције, размножавање појединих сојева нормалне бактеријске флоре као и појава бактерија које нису специфичне за вагиналну флору може довести до вагиналних инфекција.

Бактеријска вагиноза карактерише се поремећајем нормалне вагиналне флоре, са смањењем бројности *Lactobacillus* spp. и порастом броја анаеробних грам-варијабилних кокобацила (*G.vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp.,

Fusobacterium spp., *Prevotella* spp., *Prophyromonas* spp. и *Peptostreptococcus* spp.) и гениталне микоплазме (*Mycoplasma hominis*) [6]. Поред ових променама у вагиналној флори, долази и до промена вагиналног рН и вагиналне секреције. Најчешћи узрочници су *Streptococcus* (посебно Б групе), *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealiticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Proteus vulgaris* и *Toxoplasma gondii*. Повећан број ових микроорганизама у вагини, може асцендентно довести и до запаљенских обољења материце, јајовода и јајника, што за последицу може имати хронично запаљенско обољење мале карлице (PID - *Pelvic inflammatory disease*) [7].

Антибиотска терапија овог обољења се заснива на употреби метронидазола или клиндамицина, орално или интравагинално [8]. Међутим и поред употребе ова два антибиотика, око 10-15% жена не реагује на терапију после једног месеца, док се рецидиви јављају у 30% случајева у току три месеца, односно 50-80% случајева у току године [9]. Последњих година студије су доказале већу резистентност анаеробних бактерија вагиналне микрофлоре на клиндамицин, мада постоје и докази о резистентности на метронидазол [10]. Зато је терапија бактеријске вагинозе постала веома интересантна тема за истраживања како узрочника, тако и адекватних антибактеријских средстава који би се борили са проблемом резистенције.

Резистенција на ове антибиотике је објављивана у многим радовима. Голдстеин ет ал, у 1993.год. су демонстрирали 20% резистенције *G. vaginalis* на метронидазол а касније, 2002.год. у сличној студији показали да је резистенција на метронидазол 29%, док постоје студије које показују резистентност 68% анаеробних бактерија одговорних за БВ [11, 12]. Разлози резистенције нису баш најјасније објашњени, али интересантна је сличност између гена и механизма резистенције патогених бактерија и бактерија које производе антибиотике на које су ове бактерије резистентне [10]. Као основни механизми резистенције везани за антибиотике којима се тертирају бактеријске вагиналне инфекције наводе се:измена пропустљивости ћелијских овојница (смањење броја порина или измена у њиховој препустљивости који су место продора антимикубног лека кроз липидни слој мембране бактерије), или још чешће измена структуре рибозома (настаје на месту деловања лека и последица је активности ензима на рибозомалну РНК бактерија) [9].

Етерска уља су секундарни метаболити биљака, дефинисани као комплексне мешавине липофилних течних, мирисних, испарљивих компоненти садржаних у секреторним структурама ароматних биљака [13]. Основне активне компоненте етарских уља су: терепеноиди (доминантне и економски најзначајније компоненте), алифатичне испарљиве компоненте, ароматичне испарљиве компоненте, супстанце које садрже азот и сулфанце које садрже сумпор [14]. Бројним испитивањима различитих етарских уља утврђено је да се, за разлику од конвенционалних антибиотика, резистенција не ствара управо због великог броја различитих једињења која и појединачно испољавају снажно антимикубно деловање, али је изразита специфичност њихових синергистичких ефеката који у ствари и спречавају настанак отпорности [13]. Међутим, без обзира на бројне податке о антимикубној активности природних производа, број тестираних микроорганизама је релативно мали и не укључује новије мултипло резистентне сојеве. Према расположивим подацима за израду лековитих препарата, фармацеутска индустрија користи у Немачкој 12.500 активних супстанци из биљних дрога, Италији 9.000, Француској 8.000, а у Великој Британији 5.500. Од свих препарата који се кристе у Русији 50 % су биљног порекла [15].

У данашње време ароматичне биљке из породице *Lamiaceae* и *Apiaceae* представљају веома важне потенцијалне изворе биолошки и фармаколошки активних супстанци, чије је дејство доказано у бројним научним студијама. Још од давнина ове биљке се користе због свог антибактеријског, спазмолитичког, антиоксидантног, антимикотичког и бројних других дејстава [14]. Доказано је антиоксидантно и антибактеријско дејство које испољава око 100 испарљивих састојака етарских уља фамилије *Lamiaceae* [16]. Ова два дејства су веома важна за регулисање оксидо-редукционог потенцијала и нормалне бактеријске флоре, који су главни предуслов за постизање нормалне вагиналне флоре жене у било којој доби живота [1]. Међутим, биоактивне компоненте етарских уља су нестабилна и лако испарљива једињења, која могу да промене хемијску структуру, а тиме и физиолошко дејство, па се велика пажња усмерава на развој инкапсулационих техника које омогућавају задржавање биолошке активности дате супстанце, као и њено контролисано и локализовано ослобађање при достизању циљаног ткива.

Постоји велики број радова који потврђује снажно антимикубно деловање ових природних супстанци, па је антимикубна активност већине ароматичних и лековитих биљних врста које се данас и комерцијално користе веома добро документована [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26].

Ова студија ће се бавити испитивањем антимикубног деловања етарских уља кима, коријандера, морача, жалфије, оригана, еукалиптуса и тимијана на изоловане узрочнике бактеријских и гљивичних инфекција; одређивањем минималне инхибиторне (МИС) и минималне бактерицидне концентрације (МВС) етарских уља; испитивањем ин витро бактерицидног и фунгицидног деловања етарских уља у односу на конвенционалне антибиотике и антимикотике који се користе у лечењу бактеријских и гљивичних инфекција спољних гениталија жене; формулисањем и испитивањем мукоатхезивног *Drug Delivery System-a* (хитозанске честице са етарским уљем тимијана) који ће се контролисаним отпуштањем етарског уља за испијање вагиналне слузнице обезбедити антимикубно и антифунгицидно деловање у предвиђеном периоду.

2. ЦИЉ РАДА

Циљ овога рада је:

1. да се испита антимикубно деловање етарских уља кима, коријандера, коморача, жалфије, оригана и тимијана на изоловане узорке бактеријских и гљивичних инфекција;
2. да се утврди минимална инхибиторна (MIC) и минимална бактерицидна концентрација (MBC) етарских уља *in vitro*,
3. да се испита *in vitro* бактерицидно и фунгицидно деловање етарских уља у односу на конвенционалне антибиотике и антимикуботике који се користе у лечењу бактеријских и гљивичних инфекција спољних гениталија жене.
4. да се формулише мукоадхезивни *Drug Delivery System* (хитозанске честице са етарским уљем тимијана) који ће контролисаним отпуштањем етарског уља из раствора за испирање вагиналне слузнице обезбедити антимикубно и антифунгицидно деловање у предвиђеном периоду.

3. ХИПОТЕЗА

1. Етарска уља кима, коријандера, морача, жалфије, оригана и тимијана инхибирају раст издвојених бактерија и гљивица изазивача вулво-вагиналних
2. МИС И МВС испитиваних етарских уља су упоредиви са МИС и МВС комерцијалних антибиотика
3. Мукоадхезивни *Drug Delivery System* -хитозанске честице са етарским уљем тимијана, ће отпуштати етарско уље тимијана у предвиђеном периоду, и овако формулисан раствор за испирање вагиналне слузнице ће обезбедити антимикробно и антифунгицидно деловање

4. ОПШТИ ДЕО

4.1. БАКТЕРИЈСКА ВАГИНОЗА

4.1.1. Вагинална микрофлора

Физиолошку микрофлору човека чине резидентна и транзиторна микрофлора. Резидентна (стална) микрофлора се састоји од бактерија које су нормално присутне у некој средини или животној доби, релативно је стабилна и не мења се више година (спонтано се реституише ако дође до промена). Транзиторна (налетна) микрофлора се састоји од непатогених или условно патогених микроорганизама који колонизују кожу или слузокоже више сати или дана, али се не реституише када се одстрани. Бактерије насељавају само неке регије организма, док су друге стреилне. Примарно стерилне регије су крв, ткивне течности и ткива. Понекада микроорганизми могу продрети кроз заштитне баријере (кожу и слузокожу), и доспети у ткива и крвоток, али тада се одстрањују филтрацијом кроз плућне капиларе или се са њима боре ћелије ретикулоендотелног система.

Нормална бактеријска флора има бројне улоге у човековом организму: продукција бактериоцина, заштитни ефекти метаболичких процеса, компетиција за храну и рецепторска места, екзоензими, стимулација имуног система и продукција витамина К и Б [25]. Могући су и негативни ефекти физиолошке микрофлоре на организам човека који се манифестују кроз појаву опортунистичких реакција (ендогене болничке инфекције, канцерогеност бактеријских метаболита (амини у цревима)).

Најзначајнији фактори који утичу на особине и састав нормалне бактеријске микрофлоре су: особине ткива, рН, оксидо-редукциони потенцијал, животно доба и различите природне антибактеријске супстанце, различите и бројне интеракције међу бактеријама које чине нормалну микрофлору које се огледају у компетицији за храну, инхибиторној активности метаболичких продуката (водоник-пероксида, незасићених масних киселина), продукција антибиотика и бактериоцина. Механизми неспецифичне или природне имуности домаћина представљају прву линију борбе од инфективних агенаса, а то су: баријера на месту уласка микроорганизама, фагоцитоза, запаљенска реакција, активација система комплемента алтернативним путем, постојаје физиолошке микрофлоре, дејство антибактеријских супстанци.

Вагинална микрофлора је компликована средина, састављена од различитих микробиолошких врста у различитом односу и количини. Екосистем вагине је под утицајем бројних фактора, као што је: садржај гликогена у епителним ћелијама, глукозе, рН вредност, хормонски ниво, утицај средстава за контрацепцију, године, антимикробна средства, као и начин њихове примене [27].

Непосредно по рођењу вагину насељавају лактобацили који су ту присутни све док је присутна ниска рН вредност. Када се рН помери ка неутралној вредности, то траје до пубертета, лактобациле замене коке и бацили [28]. У пубертету под утицајем естрогена, лактобацили поново постају преобладајућа флора и својим метаболизмом гликогена, ослобађају киселе продукте и повећавају ацидитет на

слузокожи [4]. После менопаузе лактобацили поново нестају и поново се јавља мешана бактеријска флора [29]. Нормалну вагиналну средину обезбеђују хормони јајника, естроген и прогестерон, гликоген вагиналног епитела, Дедерлајнови бацили или *Lactobacili* и адекватна рН вредност вагине, која нормално износи у просеку 4,0 [30].

Адекватна вагинална флора обезбеђује њену заштитну улогу у односу на гениталне органе изнад ње. Њена заштитна улога се физиолошки смањује у току менструације [31], али такође се нарушава код уношења инфекције споља, хиперсекреције грлића материце, претераних вагиналних испирања, присуства страних тела у вагини, исцрпљујућих болести попут *Diabetes mellitusa*, у трудноћи, код хормонских поремећаја, при лечењу антибиотцима [30].

Као што је већ поменуто, вагинална флора здраве жене у репродуктивном периоду, доминантно садржи *Lactobacillus* врсте бактерија, које имају заштитну улогу и спречавају инфекције урогениталног тракта, и чије смањење повећава ризик појаве патогених бактерија које су узрок различитих инфекција и патолошких стања [32]. Протективна улога лактобацила се огледа пре свега у продукцији различитих једињења која су одговорна за нормалу вагиналну флору. Најважнији продукти ових бактерија су: водоник пероксид (H_2O_2), који има токсично дејство на друге организме и спречава њихово насељавање у вагини [29]; млечна киселина која одржава киселу средину (рН мање од 4,5) и бактериоцини (антимикробни пептиди) који спречавају раст потенцијалних патогена [4]. Већина бактерицина је изолована из врста *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus fermentum* [33]. Зато се ове врсте могу користити и као потенцијални пробиотици у терапији инфекција уринарног тракта и вагине [34]. Остале заштитне функције лактобацила се огледају у различитим улогама различитих врста *Lactobacillus*, које се остварују преко коагрегације са одређеним патогеним бактеријама, адхеренције са епителним ћелијама вагине и формирања биофилма који је својеврсна баријера која спречава колонизацију патогена [35]. *Gardnerella vaginalis*, анаероб, и понекада *Mycoplasma hominis* и *Mobiluncus* су бактеријске врсте које су такође нормално присутне у вагиналној флори у малим количинама [36].

4.1.1.1. Вагинални рН

Порекло млечне киселине која ацидификује вагину није довољно познато. Широко је прихваћена чињеница да се током периода повећаног лучења естрогена (жене у генеративном периоду) велике количине гликогена депонују у вагиналном епителу и да се гликоген анаеробним путем метаболише у млечну киселину. Није утврђено да ли се млечна киселина примарно продукује од стране бактерија у вагини или од стране вагиналних епителних ћелија. Хумане ћелије могу да продукују само Л-изоформу лактата, док бактерије могу да продукују и Л- али и Д-изоформу лактата. Више од 50 % млечне киселине припада Д-изоформи лактата, што намеће закључак да су бактерије у вагини, а не епителијалне ћелије примарни извор млечне киселине у вагини. Поред конверзије гликогена у лактате, и формирање H_2O_2 из интермедијарних и суперфицијалних епителијалних ћелија вагине доприноси одржавању рН вагине. [11, 30]

Нормална вагинална микрофлора има рН вредност од 3,5 до 4,5, и ова вредност се одржава активношћу лактобацила који су преобладајуће врсте у

нормалној вагиналној флори и претварају гликоген из вагиналног епитела у млечну киселину, чиме одржавају ову рН вредност [37]. Редукција киселости вагине је један од најзначајнијих знакова бактеријске вагинозе.

Нормална вагинална флора се карактерише динамичким балансом између *Lactobacillus spp.* и потенцијалних патогена. Када еквилибријум вагиналне флоре буде нарушен, број лактобацила се смањује, а као последица тога организми који су нормално супримирани од стране лактобацила сада пролиферишу. Повећање рН вагине носи ризик од превременог прснућа плодних овојака, превременог порођаја и мале порођајне тежине. [6]

Поремећај вагиналне флоре може се видети у: [6]

- Бактеријској вагинози, *Candida* вагинитису, инфекцији *Trichomonas vaginalis*
- Трудноћи, током менструалног крварења, у постменопаузи
- Стресу и малнутрицији
- При коришћењу антибиотика, оралних контрацептивних средстава
- При коришћењу интравагиналних купки и крема, пенушавих купки и јаких детерџената за прање рубља

Спољашњи фактори који могу да интерферирају са рН су: [6]

- Вагиналне креме
- Семена течност
- Крв
- Скорашњи сексуални однос
- Менструална, цервикална и матерична секреција

рН вредност је веома важна за апсорпцију апликованог лека, па према томе и од великог значаја за *Drug Delivery System* који ће бити апликован [44].

4.1.2. Бактеријска вагиноза

Бактеријска вагиноза (БВ) је полимикробна, примарно анаеробна инфекција. Карактерише се поремећајем нормалне вагиналне флоре, са смањењем *Lactobacillus spp.* и порастом броја грам-варијабилних кокобацила (*Gardnerella vaginalis*), анаеробних микроорганизама (*Mobiluncus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Prophyromonas spp.* анд *Peptostreptococcus spp.*) и гениталне микоплазме (*Mycoplasma hominis*) [39]. Поред ових промена у вагиналној флори, долази и до промена вагиналног рН и вагиналне секреције [40].

Бактеријска вагиноза не представља болест у класичном смислу, већ више синдром поремећености у саставу вагиналне флоре, а настаје као резултат симбиотског међусобног дејства неколико различитих бактеријских врста: *Streptococcus* и то посебно групе Б, *Stafilococcus*, *Escherihia colli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trihomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealiticum*, *Gardnerela vaginalis*, *Proteus vulgaris* и *Toxoplasma gondi* [41].

Лактобацили су грам позитивне бактерије, које одражавају вагиналну киселост и кључни су у одржању равнотеже здраве вагиналне флоре. Они разграђују угљене хидрате до млечне киселине, а производе водоник пероксид (H_2O_2) који зауставља раст патогених бактерија [42]. Када наступи бактеријска вагиноза, вагинална флора се мења, смањује се концентрација лактобацила који производе водик пероксид и повећава број других бактерија укључујући *Gardnerella vaginalis*, *Prevotellu spp.*, пептострептококе и *Mobiluncus spp.* [43] Умножавање тих бактерија повећава производњу ензима који разграђују вагиналне пептиде до амина, а како и рН постаје више алкалан, амини испаравају и појављује се специфичан неугодан мирис. Амини такођер доводе до љуштења ћелија епитела материце, и тако настаје исцедак карактеристичан за бактеријску вагинозу [44]. Повећана алкалност не одговара расту лактобацила, који могу да живе само до рН 4,5 чиме се додатно смањује производња водоник пероксида који кочи раст гарднереле. *Gardnerella* налаже на зидове материце лепећи се на ћелије плочастог епитела које се љуште и стварају се микроскопски препознатљиве "clue" ћелије [44].

4.1.2.1. Дијагноза БВ

Симптоматологија вагинитиса углавном је блага. У 30 % случајева протиче потпуно асимптоматски или се манифестује обилнијим вагиналним секретом заударавућег карактера, мириса устајале рибе - тзв. "fishy odor" [44]. Дуго се сматрало да вагинитис представља мање значајно стање, али у последње време доводи се у везу са инфекцијама горњег гениталног тракта, постоперативним инфекцијама и цервикалним новотворевинама, а у трудноћи изазива упалу плодних овојака, преверемено прснуће плодних овојака и послепорођајну упалу материчне слузокоже [45]. Инциденца ове болести се креће око 15-25 % у адолесценткиња и у 25-35 % жена репродуктивног доба [46]. Пацијенткиње се углавном жале на обилну секрецију из вагине непријатног мириса, који подсећа на мирис покварене рибе, пруритус и диспареунију [47]. Међутим, половина жена са налазом бактеријске вагинозе нема симптома. Тек микроскопским прегледом након засејавања бриса цервикса налази се мноштво бактерија са десквамираним епителним ћелијама и леукоцитима. Киселост вагине је смањена са рН изнад 4,2. У форниксима и вагиналним зидовима у мањој мери и на површини грлића материце, виде се црвене, хеморагичне папуле [48].

Два су основна начина дијагнозе бактеријске вагинозе: клинички према Амселу [49] и други на основу микроскопског налаза [50].

Бојење узрока методом по *Gramu* и вредновање степена поремећаја према *Nugotovim kriterijima* [51] је златни стандард за дијагнозу бактеријске вагинозе, али се ретко користи у клиничкој пракси. Вагинална флора испитана овом методом се карактерише као нормална (*lactobacillus* преобладајућа), интермедијална и БВ (*lactobacillus* дефицитарна) [51].

Амсел је, дао критеријуме за дијагностику бактеријске вагинозе, ако су присутна најмање три од четири знака болести: [49]

- хомогени вагинални исцедак
- рН вагине > 4.5

- позитиван амин тест
- налаз "clue" ћелија

Вагинални секрет је беличасто сив, млечне конзистенције често пенушав и обилан, карактеристичног мириса, рН већи од 4.5 и одређује се потапањем лакмус хартије у задњи форникс вагине. Позитиван амин тест је веома снажан мирис на устајалу рибу нарочито после додавања 10 % хидроксида, а налаз "clue" ћелија значи груписање ћелија које су преплављене бацилима [49].

Други начин дијагнозе вагиноза врши се одређивањем степена чистоће вагиналног секрета и микробиолошким испитивањем, односно одређивањем вагиналног бриса са антибиограмом, а код узнатредовалих инфекција и на основу клиничке слике т.ј. гинеколошког прегледа [52].

У класификацији степена чистоће вагиналног секрета разликујемо шест група: [52]:

I и *II* група вагиналног секрета представљају нормалан налаз, односно тада се уочава нормална вагинална флора.

III група вагиналног секрета представља присуство леукоцита и бактерија, најчешће стафилокока, стрептокока или цревних бактерија, као што су *E. coli* или *Enterococcus*. Често је тада присутна и уринарна инфекције овим бактеријама, па се обавезно спроводи лечење удружене инфекције, антибиотицима и вагиналетама направљеним према антибиограму. У ову групу спадају и *bakterijske vaginoze*.

IV група вагиналног секрета представља инфекцију изазвану бактеријом *Neisseria gonorrhoeae*,

V група вагиналног секрета подразумева инфекцију протозоом *Trichomonas vaginalis*. Преноси се сексуалним путем или путем контаминираних предмета, купањем у базенима.

VI група вагиналног секрета представља инфекцију гљивицом из рода *Candida albicans*.

4.1.2.2. Антибиотска терапија бактеријске вагинозе (БВ)

Антибиотска терапија је главни пут у третирању бактеријске вагинозе. Антимикробна средства су усмерене ка сузбијању абнормалне вагиналне флоре убијајући патогене микроорганизме који су изазивачи БВ. [8]

Антибиотска терапија бактеријске вагинозе је општа (per os) и локална према антибиограму. Антибиотици који се традиционално користе у терапији БВ су метронидазол (дериват 5-нитро-имидазола) и клиндамицин, орално или интравагинално [53]. Поред њих користе се и остали деривати 5-нитро-имидазола као што су тинидазол, и у последње време секнидазол, у форми таблета или гела [54]. Они инхибирају анаеробе који подрзавају развој *Gardnerelle vaginalis*, али немају инхибиторно дејство на лактобациле, што је од изузетног значаја [53, 55, 56]. Клиндамицин, који спада у линкозамидне антибиотике, представља алтернативе за деривате 5 нитро фурантоина, метронидазола пре свега [57, 58]. Сви ови антибиотици имају успешност у 70-80% случајева, после четири недеље антибиотске терапије [59]. Због оваквих резултата, као и честих рецидива, у последње време се приступило испитивању употербе других антибиотика у терапији БВ,

ципрофлоксацин, еритромицин, млечна киселина, водоник пероксид, сам или у комбинацији, како би се превазишли ови проблеми [60, 61, 62, 63]. Међутим, након бројних студија поређења антибактеријског дејства разних фармацеутских облика неколико врста антибиотика, пробиотика и водоник пероксида, утврђено је да орални клиндамицин и метронидазол дају најбоље резултате. Такође је утврђено да терапија овим антибиотикима не изазива вагиналну кандидијазу након седам дана, нити да клиндамицин узрокују дијареју након пет дана терапије [64].

Ефикасност овог начина лечења износи 70-75 %, али је резистенција на ове антибиотике све чешћа појава приликом лечења, посебно на клиндамицин [65]. Метронидазол је лек који се користи већ три деценије, и доказана резистенција је свега у 3% случајева. Међутим, и поред успешне антибиотске терапије, доказано је да већ након једног месеца од излечења 10-15% жена има поновљену БВ [66].

Просечно излечење бактеријске вагинозе је у 30% случајева након три месеца, док 50-80% жена у току једне године понавља терапију користећи и друге лекове. [54] Сматра се да проблем лежи у поновљеној терапији истим антибиотикима на које је већ уочена резистенција. Ова резистенција се објашњава или променом бактеријске флоре вагине или повећаном отпорношћу која је настала у процесу прилагођавања патогена, изазивача бактеријске вагинозе на комерцијалне антибиотике. [67, 68, 69, 70]

Како се болест и поред терапије и лечења понавља у више од 80 % случајева, лечење треба усмерити према профилакси [71].

Поред конвенционалних приступа, неколико алтернативних приступа заслужује пажњу [71]. То су лекови који делују као антисептици и дезинфицијенси, лекови који закисељују материцу и пробиотици, а могу се користити као самостална терапија или у комбинацији са антибиотикима. Веома је интересантна студија која је показала да пробиотици примењени 30 дана орално имају исте терапијске ефекте као метронидазол, и када се дају интравагинално два пута дневно у виду вагиналних пробиотских таблета имају већи ефекат од метронидазол гела након петодневне примене. [73, 74]

Антисептици и дезинфицијенси се користе већ пола века, делују на бактерије неспецифичним механизмом па се на њих не развија резистенција, сматрају се сигурним за слузницу у препорученој концентрацији. [75] Антисептици делују неспецифичним механизмом на зидове бактеријске ћелије нарушавајући њихову структуру. [76] Постоји веома мали број доказа о резистенцији бактерија на антисептике па се они широко користе као антибактеријска средства. Веома често се користе у саставу вагиналних купки као део третмана бактеријске вагинозе, али обзиром да се могу купити без лекарског рецепта постали су непопуларни за ове сврхе. У многим земљама се преписују за третирање БВ, мада тачни докази у сузбијању ове болести не постоје. [77] Постоје студије које се баве поређењем дејства антисептика са стандардним антибиотикима или плацебо препаратима у третирању бактеријске вагинозе [78, 79]. Најчешће се преписују повидон јод, водоник пероксид, бензидамин, борна киселина, цетримид, бензалконијум, сребро и сребро нитрат, калијум перманганат, натријум хипохлорит и хлорхексидин. Поред антисептика, млечна киселина такође може послужити као алтернативно средство у регулисању киселе рН вредности вагине, која не сме бити мања од 4, 5, што је јако тешко очувати обзиром да менструални циклус повећава рН вредност, као и семена течност па се препарати са млечном киселином препоручују како за лечење, тако и за профилаксу бактеријске вагинозе. [80, 81, 82] Узимајући у обзир вишеструко

дејство лактобацила у одражавању здраве вагиналне флоре, пробиотици се најчешће прописују заједно са антибиотцима. Обзиром да немају нежељених дејстава, веома су интересантни за третирање поновљених инфекција које су веома честа појава код бактеријских вагиноза. [83, 84]

Иако антибиотици дају одличне резултате, доказано је да се симптоматска БВ врати код петине пацијената, већ један месец након лечења [85], док половина лечених пацијената поново развије инфекцију већ након три месеца, а 85% пацијената дугорочно ће поново развити болест [86]. Зато је терапија БВ веома инетресантна област са становишта изналажења нових алтернативних препарата, који би се користили топикално и који би у себи садржали антимикуробне супстанце које немају специфичан механизам дејства, као и пробиотике или млечну киселину који би деловали профилактички и одржавали перманентно нормалну вагиналну флору.

4.2. АНТИБАКТЕРИЈСКИ ЛЕКОВИ

4.2.1. Бактерије

4.2.1.1. Грађа бакџеријске ћелије

Бактерије су најзаступљенија група микроорганизама у природи. Бактерије су једноћелијски микроорганизми или асоцијације микроорганизама, које као прокариоте имају једноставну грађу, сем ћелијског зида који је веома комплексне структуре.

Тело човека, његова ткива и ткивне течности, је природно станиште и оптимална средина за раст и развој многих врста микроорганизама са којима успоставља различите специфичне односе. Микроорганизми углавном насељавају површину тела или органа, користе метаболичке продукте човека и на тај начин „чисте“ организам од непотребних продуката; синтетишу витамине (Б, Е и К), аминокиселине и друге биолошки активне материје, које доприносе активности организма; обезбеђују неспецифичну резистенцију и представљају заштиту од патогена јер својом метаболичком активношћу онемогућавају њихов развој [87].

Бактеријска ћелија је споља заштићена овојницом, која се састоји од капсуле која представља мукоидну структуру која належе уз ћелијски зид инкапсулираних бактерија. Капсулу могу да поседују и Грам позитивне и Грам негативне бактерије, и она није неопходна за њихов живот. Основна функција капсуле је заштита бактеријске ћелије, тако да патогене бактерије стварају капсулу у организму домаћина, и губе је када се култивишу на вештачком станишту [88].

Гликокаликс је сплет полисахаридних фибрила које окружују бактеријску ћелију и имају улогу у адхеренцији бактерије за ћелију домаћина. Код бактерија које живе у природним условима, гликокаликс штити бактерије од исушења, концентрише хранљиви материјал и чини их отпорним на дејство антисептика, дезифицијенаса и антибиотика.

Ћелијски зид је ригидни вишеслојни омотач који даје облик и интегритет бактеријској ћелији. Представља хидрофобну мембрану која штити улазак многих антимикуробних лекова у ћелију. Поседују га све бактерије сем *Mycoplasma*. Има јединствен састав који потиче од пептидогликана, који се састоји од пептида и шећера. Скелет пептидогликана је састављен од наизменично поређаних молекула N-ацетилмураминске киселине и N- ацетилгликозамина спојених гликозидним везама. За сваки молекул мураминске киселине везан је тетра пептид изграђен од различитих D и L аминокиселина, од којих су најзначајније диаминопимелинска киселина која се налази само у ћелијском зиду н бактерија и D аланин који је укључен у унакрсне везе између тетрапептида, где се унакрсна веза између два тетрапептида синтетисе дејством транспептидаза, које су циљна места за бета лактамске антибиотике.

Пошто се пептидогликан налази само у бактеријским ћелијама, не у хуманим, он је циљно место за везивање антимикуробних лекова- пеницилин и цефалоспорини инхибирају његову синтезу.

Разлике у грађи ћелиског зида омогућава поделу свих бактерија на Грам позитивне и Гарм негативне. То је једна од најзначајнијих дијагностичких поступака у бактериологији, јер се све бактерије деле на Грам позитивне, које се боје тамно плаво или љубичасто и Грам негативне које се боје црвено. Бојење по граму нам указује на разлику у саставу ћелијског зида бактерија, утицају избора антимикуробних лекова, Грам позитивне су далеко осетљивије на дејство бета лактамских антибиотика. Грам позитивне бактерије имају знатно дебљи ћелијски зид изграђен углавном од пептидогликана, док Грам негативне бактерије имају тањи зид али знатно комплекснијег састава, који је састављен од двослојне спољашње мембране богате липопротеинима и фосфолипидима испод које је танак слој пептидогликана. Ендотоксин Грам негативних бактерија, на површини ћелије ослобађа се приликом лизе бактеријске ћелије. Периплазматски простор се налази између ћелијског зида и цитоплазме испуњен гелом од протеина, у коме се такође налази и бета лактамаза и други ензими, која активира одређене антибиотике. Овај простор је израженији код Грам негативних бактерија.

Цитоплазматска мембрана је трећа овојница коју имају све бактерије и неопходна за нормално функционисање бактеријске ћелије. То је танка мембране саграђена од фосфолипида и протеина, смештена испод слоја пептидогликана. Њена улога је вишестрка: транспорт хранљивих материја, има улогу митохондрија код еукариота (ту се одвија респирација), транспорт електрона и стварање енергије, ставрају се неки протеини за синтезу ћелијског зида, различити токсини и ензими који учествују у патогенези разних бактеријских обољења.

Цитоплазматска мембрана је циљно место за многе антибиотске агенсе, детерџенти који садрже липофилне групе разарају цитоплазматску мембрану, антибиотик - полимиксин, има структуру сличну овим детерџентима. Антибиотик новобиоцин инхибира синтезу ДНК, али инхибира и синтезу теихоичне киселине која је саставни део цитоплазматске мембране Грам позитивних бактерија.

Бактеријска ћелија нема једарну мембрану, већ је генетски материјал окружен гушћом цитоплазмом која га одваја од осталог дела цитоплазме. Зато се за бактеријску ћелију каже да нема једро, и сврставају се у групу прокариотских ћелија.

Бактерије имају само један циркуларни хромозом. Поред хромозомске ДНК, бактерије имају и придружене генетске елементе, екстрахромозомску ДНК - плазмиде, и мобилне секвенце ДНК (транспозибилни елементи).

Цитоплазма се састоји од аморфног матрикса у коме су смештене хранљиве материје, минерали, витамини, разградни продукти метаболизма.

Мезозоми су инвагинације цитоплазматске мембране и представљају места где се везује ДНК, имају улогу у раздвајању две нити хромозома после његове репликације.

Citoplazmatske granule служе као складиште резервне хране.

Ribozomi su састављени од РНК и представљају места где се одвија синтеза протеина. Бактеријски рибозоми су величине 70S, са подјединицама 30S и 50S, док еукариотске ћелије имају 80S рибозоме са подјединицама 60S и 40S. Ове разлике између рибозома прокариота и еукариота су основа за селективно дејство неких антибиотика који инхибирају синтезу протеина бактерија.

Nuklotidi бактерија немају нуклеарну мембрану, за разлику од нуклеотида еукариота, и митотички апарат. То је циркуларни, дволанчани молекул ДНК изграђен од 200 гена, тзв хромозомски репликон (хаплоидни хромозом који се аутономно репликује).

Plazmidi су екстрахромозомске структуре, такође састављене од дволанчане ДНК, али имају мањи број гена који су одговорни за значајне особине бактерија.

Транспозоми су делови ДНК који се у бактеријској ћелији премештају са хромозома на плазмид, бактериофаг или обрнуто па се зато зову “*jumping*” гени.

Израслине на бактеријској ћелији: флагеле и пили.

Flagele су кончасте, еластичне структуре на бактеријској ћелији које се окрећу попут пропелера и тако се бактерја креће. Код неких бактерија имају улогу у патогенези, јер омогућавају кретање бактерије према месту инфекције. Оне нису неопходне за живот бактерија, али им омогућавају кретање ка стимулансима (*taxis*), па у зависности од стимуланса имамо *chemotaxis* (храна), *aerotaxis* (ваздух), *phototaxis* (светлост).

Pili (fimbrije) су ригидне израслине које покривају бактеријску ћелију, краће од флагела, које омогућавају адхезију за специфичне рецепторе на површини хуманих ћелија, што представља значајну фазу у настанку инфекције. Карактеристичне су за Грам негативне бактерије и ту углавном граде мостиће између две бактеријске ћелије у процесу коњугације, кроз које пролази ДНК.

У свим срединама које насељавају, бактерије непрестано ступају у различите односе са другим микроорганизмима, биљкама, животињама и човеком. Размножавање бактерија је обично простом деобом, геометријском прогресијом на две ћерке. Време размножавања медицински значајних бактерија је веома брзо, време једне генерације (време потребна да се бактеријска ћелија подели), је обично 20 минута. Ређе се бактерије размножавају пупљењем, гранањем, стварањем L колонија [89].

Научник Роберт Кох је први увео још у 19. веку култивисање бактерија на чврстим подлогама, што омогућава добијање чистих култура, што је неопходно у идентификацији бактерија, испитивању биохемијских особина, антигенске грађе и осетљивости на антимикробне лекове.

Колоније се између себе разликују по облику, издигнутости, ивицама, површини, прозрачности, конзистенцији, боји (*Staphylococcus aureus*), хемолизи (α , β , γ хемолитичне), покретљивости [88].

4.2.1.2. Фактори који утичу на раст и развој бактерија

Фактори који утичу на раст и развој бактерија су бројни. Бактеријска ћелија процесом растења који се одвија у средини са повољним условима за њен живот, достиже оређену величину, дели се на две јединке, које даље настављају процес растења и деобе и тако се стварају бактеријске колоније. Угинуће бактерије настаје приликом престанка њених способности за раст и размножавање, као и губитком животно важних функција.

Најзначајнији фактори за раст и размножавање су: храна; температура (*kriofilne*, *mezofilne*- бактерије којима одговара температуре људског тела (већина патогених бактерија), *termofilne*); рН вредност средине (за медицински значајне бактерије рН је од 5,5-8,5, најчешће од 7,2-7,4); угљендиоксид као извор угљеника неопходног за изградњу ћелије (аутотрофне- користе само угљендиоксид и хетеротрофне- највећи број медицински значајних бактерија које користе угљеник из органских једињења); кисеоник (облигатни анаероби- не подносе кисеоник, аеротолерантни анаероби, факултативни анаероби- могу да расту и у аеробним и у анаеробним условима), већина медицински значајних бактерија, *Esherichia coli*, *Salmonellae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*- култивишу се у аеробној средини јер је јефтинији процес), облигатни аероби, микроаерофилне бактерије (расту у смањеним концентрацијама кисеоника- лонац или кеса); влага средине (извор Н и ОН јона, одржавање тургора, физичко-хемијског стања цитоплазме- раствори хранљивих материја лакше продиру у ћелију, раствори разградних продуката лакше се одстрањују); оксидо-редуктивни потенцијал средине у којој живе (анаеробне бактерије се брзо размножавају при нижим оксидо-редуктивним потенцијалом, аеробне при вишим), осмотски притисак и јонска концентрација (висок осмотски притисак течности која окружује бактерију који настаје од велике концентрације хране у средини отежава размену материја кроз омотаче, доводи до успореног размножавања, плазмолизе и дехидратације бактеријске ћелије, низак осмотски притисак смањује концентрацију примљене хране, отежава елиминацију штетних продуката, отежава размножавање; халофилне бактерије -траже високу концентрацију соли за раст и развој, осмофилне бактерије- траже висок осмотски притисак); површински напон (висок површински напон отежава раст и развој, низак олакшава), инхибиторне супстанце (продукти разградње протеина, разне киселине и алкохоли, угљен диоксид - доводе до инхибиције раста и размножавања) [87].

Бактеријска ћелија добија енергију оксидо-редукционим процесима. Енергија се ослобађа процесом оксидације, и троши се за разне биохемијске процесе који се одвијају у ћелији. Бактерије значајне у медицини су обично хемоорганофити- користе органске врсте енергије. Оксидација и редукција су нераздвојни процеси. Оксидација је губитак електрона или Н атома, при чему се ослобађа енергија. Истовремено се одвија редукција, при чему неко једињење прима те електроне или Н атоме, односно енергију. Највећи део енергије користи се за стварање и обнављање молекула АТП -а. Енергија из хране (катаболички процеси) конвертује се у енергију хемијских веза АТП-а, док се енергија из АТП-а користи за биосинтетске процесе (анаболичке реакције), кретање и транспорт кроз ћелијску мембрану.

Ослобађање енергије из бактеријске ћелије одвија се путем два оксидативна процеса: ферментације или ресорпције. Током ферментације органско једињење, попут пирувата, прима ослобођене електроне. Током респирације електроне прима неоргански молекул (аеробна респирација), или сулфат, нитрат или карбонат (анаеробна респирација) [88].

4.2.1.3. Улога бактерија у инфективном процесу

Поред многобројних, позитивних ефеката, микроорганизми су и један од највећих медицинских проблема, јер су многи од њих веома патогени за човека. Способност микроорганизма да изазове болест назива се патогеност. У ужем значењу патогеност представља способност инфективног агенса да изазива обољење [90]. Патогеност је генетски детерминисана (бактерија је или патогена или не), морфофизиолошка особина, у које спадају и начин исхране или дисања, тип ферментације, продукција пигмената или флагела [87]. Патогене бактерије поседују гене који кодирају синтезу појединих структура бактеријске ћелије или екстрацелуларних продуката одговорних за настанак обољења. У зависности од услова средине, различита је експресија поменутих гена и зато патогени изазивају обољења различите тежине.

Степен патогености назива се вируленција (од латинске речи *virulentia* – отровност) и представља квантитативну способност агенса да изазива обољење – вирулентни агенс изазива обољење и онда када у домаћина доспе у малом броју. Вируленција у себе укључује адхеренцију, инвазију и токсичност [90]. Тај термин је уведен у употребу још у време, када се вируленција изједначавала са патогеношћу и токсичношћу, тј. када се је веровало да су микроорганизми који изазивају заразна обољења токсични. Због тога треба истаћи да је патогеност микроорганизама генетски детерминисана, постојана особина дате врсте микроорганизама (скуп квалитета), а да је вирулентност квантитет тих квалитета код појединих сојева дате врсте. Вирулентност зависи, како од генетских предиспозиција за патогеност одређене врсте микроорганизама, тако и од фактора и механизма одбране домаћина (његове отпорности или резистенције). На вируленцију утичу и фактори спољашње средине. Већина бактерија, после дужег чувања у лабораторијама на вештачким хранљивим подлогама, делимично или потпуно изгуби своју вируленцију. Патогеност је стална особина неке бактерије, док се вируленција мења зависно од услова средине. Један микроорганизам може бити мање или више вирулентан, што одређује колико ће тешку инфекцију изазвати, али не може бити више или мање патоген. Смањење вируленције се назива атенуација, и настаје када се бактерија више пута узастопно пресејава са једне на другу подлогу и то је веома корисно при изради живих вакцина (BCG вакцина.) Повећање вируленције се назива егзалтација.

Патогеност и вируленција се могу одредити само на живом организму. Према способности да изазову обољење бактерије се дела на стриктно патогене, условно патогене (не изазивају болест, само када се створе услови- пад имунитета), апатогене или сапрофитне бактерије (не изазивају болест) [86].

Вируленција се мери бројем микроорганизама или количине токсина потребних да изазову болест у 50% тестираних животиња (ID 50-средња инфективна доза), или количином токсина који убија 50 % тестираних животиња (LD 50- средња летална доза). Што је ID, односно LD неког патогеног соја мања - то је он вирулентнији, а што је већи - то је он мање вирулентан. Код људи се инфективна доза одређује на добровољцима [87].

4.2.2. Антибактеријски лекови

Антимикробни лекови представљају групу хемијских једињења која успоравају раст или уништавају микроорганизме, у првом реду бактерије, на начин који није (у прописаним дозама) штетан по домаћина. Своје име су добили од грчке речи *anti* - против и *bios* - живот. Ако делују на ћелије бактерија (бактериостатски или бактерицидно), називају се антибактеријски лекови. Антибиотици су природни, биолошки производи различитих гљивица, док су хемотерапеутици производи хемијске синтезе [91].

Антибиотици су хемијска једињења која настају као специфични производи метаболизма микроорганизма и која показују физиолошку активност према другим микроорганизмима, тако што им селективно спречавају раст - микробиостатички ефекат, или узрокују њихову смрт - микробицидни ефекат [92]. У ширем значењу, под тим појмом се могу подразумевати све супстанце биогеног порекла које имају микробиостатичко или микробицидно дејство.

Употребља антимикробних средстава сеже још у далеку прошлост. Кинези су пре 2500 година користили усирено сојино млеко (гљивице), за лечење гнојних промена на кожи, док су Стари Египћани и Хипократ указвали на лековито дејство мирте. Постоје бројни докази о употреби антимикробних средстава као кинин за лечење маларије у Перуу, једињења живе за лечење луеса. Прва запажања антибиотског деловања имали су 1877. године Пастер и Јуберт. Они су уочили да присуство других микроорганизма у култури *Bacillus anthracis* инхибише њен раст.

Термин *antibioza* први је увео Vuillemin 1889. године, да би описао компетитивну природу заједнице организама, у којој један од њих делује деструктивно на другог. Еру антибиотика отпочео је Александар Флеминг када је 21.09.1928. у својој лабораторији открио да на Петри шољи на којој је био засејан стафилокок и на коју је случајно пала плесан (*Penicillium notatum*) из ваздуха дошло до онемогућавања даљег развоја стафилокока, и тај производ са антибиотским деловањем назвао је пеницилин. Међутим, тек 13. фебруара 1929. год излазе у јавност овакво епохално откриће. Прошло је дванаест година пре него је овај антибактеријски лек употребљен у клиничкој пракси. 1939. године Хауард Флори је изоловао из гљивице *benzyl* пеницилин, утврдио да је антибиотик довољно јак да преживи у човечијем систему, да притом задржи своје антибиотске могућности и активно делује против патогена. Тако започиње златно доба антимикробне терапије. Након тога крећу бројна открића, 1935. Домагк открива протозил, а 1943. године S.A. Waksman открива стрептомицин за лечење туберкулозе и уводи појам антибиотик. Од времена када је британска хемичарка Дороти Хоџкин дала хемијску структуру пеницилина, почела је производња хемијски модификованих антибиотика. Утолико је и споменута дефиниција проширена и на полу-синтетске али и на ретке синтетске антибиотике. Према литературним подацима, од открића пеницилина па до данас, откривено је скоро 4000 природних и око 30000 полусинтетских и синтетских антибиотика.

Захваљујући напретку науке и технологије, фармацеутска индустрија је до сада развила огроман број нових антимикробних лекова модификацијом већ постојећих природних супстанци, тако да имамо више од 50 врста пеницилина, 70 цефалоспорина, 12 тетрациклина, 8 аминогликозида и преко 40 макролида и осталих антибиотика, а на располагању је само 60 различитих антимикробних једињења чија

фармакодинамска својства допуштају да буду коришћени у клиничкој пракси у терапијске сврхе [90].

Међу њима се разликују лекови првог избора, другог избора, стратешке резерве као и могуће комбинације, а све у циљу постизања што ефикасније терапије.

Антимикробни лек треба да има следеће особине: [91].

- да поседује селективну токсичност, тј. мора бити способан да потпуно уништи патоген, а да при том има мало штетног ефекта на домаћина или да га нема уопште. Ниво селективне токсичности може бити изражен у облику терапеутске дозе, односно количине хемијског агенса неопходног за дату инфекцију, токсичне дозе, односно количине агенса у крви који није штетан по домаћина
- потребне концентрације лека за антибактеријски ефекат треба да буду постигнуте брзо и да лек има структурну стабилност да у телу истог може да се задржи довољно дуго да произведу пожељне ефекте.
- спектар деловања лека треба да буде такав да обухвати већи број микроорганизама, а структура таква да онемогући бактерији да развије резистенцију на тај лек.

4.2.2.1. Механизам деловања антибиотика за третирање бактеријских ваиноза (меитронидазол и клиндамицин)

За разлику од антисептика, који делују физичкохемијски, агресивно и неспецифично, антибиотици делују циљано, на одређење структуре бактеријске ћелије, или на ензимске активности микроорганизама [89]. Антибиотици делују само и искључиво на бактерије, грам позитивне и грам негативне, али немају никаквог утицаја на вирусе. Неки делују и на гљивице.

Механизам деловања антибактериских лекова је следећи [91]:

- Инхибиција синтезе ћелијског зида бактерије
- Инхибиција функције цитоплазматске мембране
- Инхибиција синтезе протеина
- Инхибиција синтезе нуклеинских киселина
- Инхибиција синтезе фолата

Клиндамицин је хлорирани дериват линкомицина, који га је заменио због боље антибактеријске активности (против стафилокока и анаеробних бактерија) и боље апсорпције из црева. Добро продире у кости и сва ткива, не продире у ЦНС.

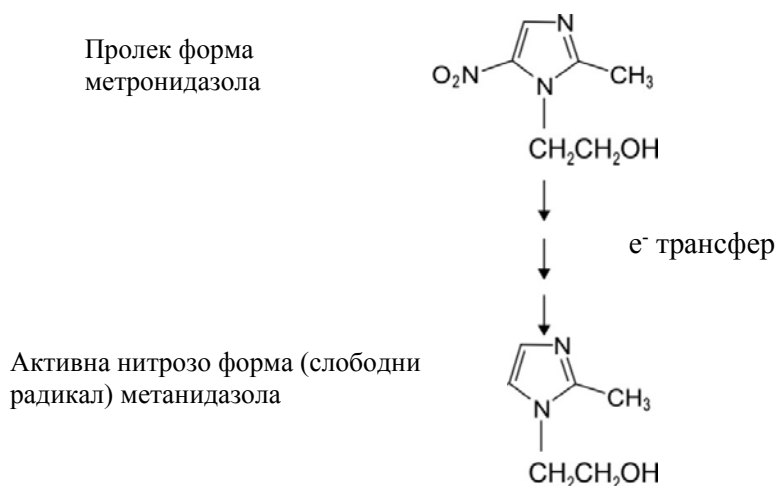
Клиндамицин инхибира елонгацију растућег полипептидног ланца везањем на 50S подјединицу рибозома бактерија и тако инхибира синтезу протеина, а такође појачава опсонизацију и фагоцитозу бактерија, активацијом комплемента.

Нежељени ефекти су ретка али опасна компликација, псеудомембранозни колитис, који настаје после операције, цешце код старијих жена, изазван бактеријом резистентном на клиндамицин. Клиндамицин спада у резервне антибиотике,

употреба се ограничава на инфекције анаеробним бактеријама или инфекције костију изазване резистентним стафилококама.

Метронидазол- користи се у терпији амебијазе и трихомонијазе. Има изразито дејство на анаеробне бактерије. Механизам дејства метронидазола се заснива на могућности нитро групе метронидазола да преузме електроне од елетрон транспортујућих протеина у ћелији, чиме се ремети синтеза енергетски богатих једињења неопходних за живот бактеријске ћелије [94]. Молекул метронидазола нитроимидазолске групе, се најпре редукује, а редуковани метаболити се оксидишу и настају супероксидни анјони и слободни радикали типа хидроксила који инхибирају синтезу или цепају ДНК, и тако делују токсично на бактерије и паразите [95]. У комбинацији са алкохолом доводи до панкреатитиса (има слична дејства дисулфираму), при дуготрајној употреби. Не треба га примењивати у трудноћи јер има тератогени ефекат.

Метронидазол је цитотоксичан на факултативне анаеробе као што су *Gardenerella vaginalis* и *Helicobacter pylori*, али механизам дејства није добро разјашњен. Метронидазол је једињење мале молекулске масе које дифундује кроз ћелијске мембране анаеробних и аеробних микроорганизама, посебно анаеробних. Молекула метронидазола се редукује од стране пируват феродоксин оксидоредуктаза система у митохондријама облигатних анаероба, што ремети њихову хемјску структуру. Овај оксидоредуктујући систем нормално продукје АТП молекуле кроз процес оксидативне декарбоксилације пирувата. Метронидазол присутан у ћелији бактерије везује електроне својом нитро групом, и спречава њихово везање за јоне водоника у нормалном циклусу. Редукцијом метронидазола ствара се концентрациони градијент који доводи до уласка нових количина лека у ћелију, чиме се ствара интермедијерно једињење и слободни радикали који су токсични за бактеријску ћелију. Редукована интермедијерна молекула метронидазола ступа у реакцију са ДНК бактеријске ћелије и доводи до фаталне дестабилизације ДНК ланца. Цитотоксично дејство метранидазола зависи од концентрације употребљеног лека што је и доказано на многим анаеробима [95].



Слика 4.1. Механизам активације метронидазола из неактивне пролек форме у цитотоксичну нитрозо форму трансфером електрона са нитро групе пролека и трансформацијом у слободан радикал у нитрозо облику. Донор електрона варира у зависности од организма.

4.2.3. Отпорност микроорганизама на деловање антибиотика (резистенција)

Иако је проналазак антибиотика престављао епохално откриће и прекретницу у борби са узрочницима бактеријских инфекција, убрзо је постала јасна чињеница да су многе бактерије отпорне на дејство антибиотика. Стварањем отпорност или толеранције у току терапије онемогућава се излечење или доводи до великог процента рецидива дате инфекције. Узевши у обзир и чињеницу да је великом броју врста бактерија потребно само 20 минута да се дуплирају, као и да бактерије које су по правилу осетљиве на одређене антибактеријске лекове могу стећи резистенцију, ствара се велика бојазан од појаве мултирезистентних бактерија. Све ово објашњава чињеницу да је појам резистенције означен као глобалан проблем.

Појава резистенције је примећена први пут код сојева *Staphylococcus aureus*, само неколико година након увођења пеницилина у терапију, где је 85% сојева постало резистентно на ову терапију. Постоје бројне разлике у брзини и механизму развоја резистентности између бактерија. Међутим, последњих година свет се суочава са све већим проблемима у антибиотској терапији какви су резистенција салмонеле на флуорохинолоне и цефалоспорине треће генерације, који су били лекови избора, мултирезистентна ешерихија коли, ванкомицин резистентне ентерококе (*VRE*), као и метицилин резистентне стрептококе (*MRSA*) код људи и животиња. Бактерије које су мултирезистентне због стицања нових гена укључују болничке грам-негативне бактерије, ентерококе и стафилококе те ванболничке сојеве салмонела, гонокока и пнеумокока. Постоје бројне студије које говоре и потврђују о све чешћој појави резистенције на конвенционална антимикробна средства што прети да постане глобални проблем [96, 97, 98, 99, 100].

4.2.3.1. Врсте резистенције

Резистенција се може испољвати на више начина:

- примарна резистенција (отпорност на *Pseudomonas* и скоро све антибиотике) ;
- стечена резистенција (отпорност која настаје у току примене антибиотика);
- укрштена резистенција (отпорност према свим антибиотцима из неке групе).

Ако је бактерија осетљива на најмање три антибиотика, тада говоримо о мултиплој резистенцији, а ако се резистенција може пренети са отпорних на осетљиве сојеве говоримо о инфективној, преносној резистенцији. Нерационална употреба антибиотика у терапијске и профилактичке сврхе довела је до инфективне, мултипле резистенције међу различитим сојевима бактерија, што је последњих година добило епидемијске размере. Два су главна механизма настанка бројних независних гена резистенције и мутације у једном гену или генском комплексу који посредује резистенцију на серију независних једињења. Појава мултирезистентних сојева настанком мултиплих независних гена резистенције настаје поступним трансфером гена и околинском селекцијом у срединама са великом применом антибиотика. Насупрот томе, мутација у једном гену може настати тренутно.

Према пореклу резистенција може бити :

- Урођена – недостатак циљне структуре за лек (микоплазме су резистентне на дејство бета –лактама услед недостатка ћелијског зида)
- Стечена- негенетичког или биохемијског порекла и генетичког порекла (хромозомског или плазмидског). Стечена резистенција је главно ограничење за ефикасну хемотерапију и настаје у току примене антибиотика. Резистенција се може развити мутацијом постојећих или настанком нових гена. Нови гени који посредују резистенцију обично се шире од ћелије до ћелије помоћу мобилних генетских елемената као што су *plasmidi*, *transpozoni* или *bakteriofagi*.

Стечена резистенција једне бактерије на бројне антибиотике постаје све чешћа. Већина ових последњих настала је у другим земљама, али су се усадили и у неким регијама САД. Мутације које омогућавају резистенцију на бројне, разнородне актибактеријске лекове проказују се на протеинима спољашње мембране (порини) грам негативних бактерија. Ове мутације утичу на пермеабилност бактерија за бета-лактаме, хинолоне, тетрациклине, хлорамфеникол и триметоприм. Мултирезистентни бактеријски изолати постају све већи проблем у америчким болницама; већ су идентификовани сојеви резистентни на све расположиве бактерије.

- Негенетичке резистенција. Антибактеријско дејство лекова је најизраженије када су бактерије у фази раста и размножавања. Најбољи пример за то је *Mycobacterium tuberculosis* који је отпоран на антитуберкулотике у фази мировања, све док бактерије не крену да се размножавају и услед пада имунитета домаћина постају потпуно остљиве на те исте лекове. Други пример је појава Л облика бактерија отпорних на пеницилине, који настају услед губитка ћелијског зида (пептидогликана) бактерије на коју је деловао пеницилин и оне прелазе у Л облике отпорне на бета- лактаме.
- Генетичка резистенција. Настаје као последица измене у генима која може бити *хромозомски* или *екстрахромозомски* детерминисана.

хромозомска резистенција је последица спонтаних мутација хромозома који контролише осетљивост на одређене антибиотике. Најчешће је последица измењене структуре рецептора за које се везује неки лек (алтерација Р12 протеина на 30С подјединици рибозома за коју се везује стрептомицин).

екстрахромозомска резистенција Генетски материјал бактерија поред хромозома чине и екстрахромозомске структуре: плазмиди и транспозоми. Гени ових структура који су носиоци резистенције се лако преносе са отпорних на осетљиве сојеве, исте или различитих врста бактерија механизмом коњугације и трансдукције.

Р (*Resistance*) - иако и плазмиди носе гене резистенције, транспозоми су још значајнији у ширењу резистенције јер су веома покретљиви. Резистенција се заснива на преносу гена резистенције трансдукцијом када су у питању Грам –позитивне бактерије и њихова резистенција на бета- лактаме. Трансдукција је могућа само унутар једне врсте бактерија.

Када су у питању Грам- негативне бактерије за преношење гене резистенције су одговорни плазмиди механизмом коњугације и F (*Fertility*). Фреквенца преноса гена је велика и могуће и између различитих врста бактерија.

Резистентне бактеријске популације размножавају се у местима великог коришћења антимикробних лекова, где се служе селективним предностима над осетљивом популацијом.

Главни механизми које бактерије користе у одбрани од деловања антимикробних лекова су :

- деструкција лека,
- алтерација или прекомерна производња антибактеријског циља,
- смањење пермеабилности ћелијског омотача за лек и
- активна елиминација једињења из унутрашњости ћелије

Откривено је више механизма којима бактерије постају резистентне на антимикробне лекове:

- а) Ензимска деструкција или инактивација лека- најчешћи облик резистенције, углавном на бета- лактамске антибиотике, који представљају 70% свих прописаних антибиотика. За ову врсту резистенције одговорни су литички ензими- бета лактамазе (пеницилазе или цефалоспориназе), и има их више од 60 врста различитог спектра деловања и биохемијских особина. У присуству малих количина пеницилина индукује се синтеза 50-80 пута већих концентрација лактамаза код пеницилин резистентних сојева. Постоје различити инхибитори пеницилазе као што је клавулонска киселина и сулбактам који у комбинацији са пеницилинским леком решавају проблем резистенције на пеницилинске антибиотике. Нажалост, инхибитори (нпр. клавуланска киселина и сулбактам) не вежу се за све бета-лактамазе па не могу спречити инактивацију путем свих бета-лактамаза. Није произведен ни један бета-лактамски антибиотик или инхибитор који се може одупрети свим познатим бета-лактамазама. Овај механизам резистенције је значајан и код аминокликозидних антибиотика, синтеза других ензима, где је откривено више од 20 оваквих литичких ензима- разне ацетилазе, аденилазе, хидролазе. Везивање ензимског протеина за слободне групе у молекулу лека онемогућава улазак лека у бактеријску ћелију.
- б) Измена структуре РВР- настаје мутацијом гена за РВР (penicillin binding protein), чиме настају РВР слабијег афинитета за пеницилин на мембрани бактерија. Овим механизмом се објасњава резистенција *MRSA*, тзв метицилин резистентни *Stafilococcus aureus*. Према ове алтерације могу настати мутацијом постојећих гена, јављање нових РВР-гена (као у стафилококној резистенцији на метицилин) или нових делова РВР-гена (као у пнеумококној, гонококној и менингококној резистенцији на пеницилин) је спољашње.
- в) Смањена кумулација антибиотика- убрзано испумпавање антибиотика, настаје мутацијом гена за синтезу протеина, транспортера који износи антибиотик из бактерије. Овај вид резистенције је карактеристичан резистенцију стафилокока, псеудомонаса на макролидне антибиотике, тетрациклине и хинолоне.
- г) Измена циљног ензима- механизам важан за пеницилине и њихове немогућности да се вежу за циљне ензиме на цитоплазматској мембрани бактерија- РВР (протеини за које се везује пеницилин), која настаје или услед смањеног афинитета за РВР или због смањене продукције овог протеина. Пример је метицилин резистентни сојеви *Staph. aureus* (*MRSA*), гонокок.

- e) Измена пропустљивости мембране- настаје мутацијом гена за синтезу протеина мембране бактерија услед чега долази до смањење броја порина или измена у њиховој пропустљивости који су место продора антимикуробног лека кроз липидни слој мембране бактерије, тако да бактеријска мембрана постаје непробојна за антибиотике. Овај вид резистенције је чест код резистенције Грам- негативних бактерија на бета лактаме и флуорохинолоне, као и код резистенције ентеро бактерија на тетрациклине.
- f) Измена структуре везног места на рибозомима-настаје на месту деловања лека преко рецептора на 30С и 50С субјединици и последица је активности ензима на рибозомалну РНК бактерија. Овај механизам је одговоран за појаву резистенције бактерија на тетрациклине, макролиде и аминокликозидне антибиотике (стрептомицин).
- g) Измена метаболичког пута-алтерација ензима- механизам који је одговоран за резистенцију бактерија на сулфонамиде, триметоприм и флуорохинолоне. Стварају се измењени ензими који немају афинитет за антибактеријски лек чије се специфично дејство заснива на инактивацији тих ензима, и може бити детерминисано мутираним генима за одређен ензим (ДНК гираза- *gyr* А или *gyr* Б гени на хромозому код флуорохинолона.)

4.2.3.2. Резистенција на метронидазол и клиндамицин

Метронидазол је лек који се користи за третман анаеробних вагиналних инфекција већ задњих 45 година. Први пут је употребљен за третирање инфекције узроковане *Trichomonas vaginalis* бактеријом, и данас је лек избора за третирање бактеријских вагиноза и других вагиналних инфекција [101].

Сам лек је у неактивном облику и активација метронидазола се одвија процесом интрацелуларне редукције молекула лека у активни нитрозо слободни радикал, тако што нитро група метронидазола прима електрон, односно редукује се (Слика 4.1.). Ова редукована нитрозо-радикал форма метронидазола има цитотоксично дејство на бактеријске ћелије, механизмом инхибиције синтезе ДНК молекула и инактивацијом бактеријске ДНК и ензима, што доводи до ДНК деградације и смрти ћелије анаероба. Обзиром да аеробне бактеријске ћелије, немају електрон транспортне протеине са недостатком негативног редокс потенцијала, то је и разлог зашто нису осетљиве на метронидазол. Електронски донори бактеријске ћелије које учествују у редукцији лека варирају од врсте до врсте [102]. *Trichomonas vaginalis* и *Gardnerella vaginalis* спадају у групу антимиохондријалних анаероба који поседују хидрогенозоми. То су посебне органеле у којима се одвија процес оксидативне декарбоксилације пирувата: стварањем молекула АТП-а процесом оксидације ацетата (насталих у процесу гликолизе из пирувата посредством ензима пируват –феродоксин-оксидоредуктазе.) У присуству метронидазола, њихове нитро групе заробљују електроне из феродоксина и настају слободни нитро-радикали, активна форма лека. Створени нитро-радикали оштећују ДНК и доводе до смрти бактеријске ћелије. Анаеробне бактерије какви су изазивачи БВ имају редуктивни капацитет да активирају метронидазол, док аеробне бактерије и ћелије сисара немају [101].

Резистенција на метронидазол је уочена у САД још шездесетих година. Као узрок резистенције наводе се бројни фактори: редукована активност пируват – феродоксин-оксидоредуктазе, промене на нивоу хидрогенозома, измењен редокс потенцијал хидрогенозома, измењен редокс потенцијал феродоксина, редукована коичина интрацелуларног феродоксина. Резистенција на метронидазол се постепено развија у фазама [103]. Као најранији стадијум јавља се резистенција на аеробне бактерије, а анаеробна резистенција се јавља теже, и то је стабилна резистенција где паразит показује веома високе леталне концентрације на метронидазол. Ово ствара проблеме у терапији, посебно ако се узму у обзир токсични ефекти и онкогени потенцијал овог лека, као и постојање укрштене резистенције *Trihonomas vaginalis* на друге 5-нитроимидазоле (тинидазол, орнидазол) [104].

Иако је број резистентних сојева *Trihonomas vaginalis* у порасту од 1962. год, ова резистенција нема епидемијски значај. У студији која је рађена у САД 1996. год. у два клиникама где је праћена појава резистенције на овај лек, утврђена је резистенција на терапију код једног пацијента у 2000-3000 оболелих од БВ, 1997. и 1998. год овај број је порастао на 17 пацијената, док је у 1999. год. 5-10 % сојева показало изванредан степен резистенције [103]. Након бројних терапијских неуспеха лечења бактеријске вагинозе, пре свега због резистенције као и одабира дозе у којој ће лек бити примењен и колико дуго, дошло се до закључка да успех терапије зависи од бројних фактора: осетљивост анаеробних бактерија на лек, интравагиналног редокс потенцијала, нивоа лека *in situ*, вагиналне микрофлоре која може модификовати количину лека *in situ* [105].

Постоји више тумачења резистенције бактерије на метронидазол, приказано у табели 3.1, а најшире прихваћена теорија показује да мутација гена за активацију ензима нитро редуктазе (*rdxA*) доводи до повећања резистенције на овај антибиотик [103].

Иако се клиндамицин сматра златним стандардом у третирању анаеробних инфекција још од шездесетих година прошлог века, резистенција на клиндамицин се региструје и у порасту је у задњих 15. година [106, 107, 108, 109].

Резистенција на клиндамицин може настати због метилације 23С рибозомске (р) РНК, и узрокована је производњом ензима најчешће кодираног у плазмидима који метилира рибозомску РНК и интерферира са везивањем антибиотика за њихов циљ. Овај ензим се зове макролид-линкозамин-стрептограмин тип 23С РНК метилаза и исти је као код стафилокока [110].

Резистенцију могу индуковати и клиндамицин и еритромицин, тако да може настати унакрсна резистенција на оба антибиотика [109].

Истраживања показују да је резистенција на клиндамицин порасла са 3% од 1987, до 16 % и 26% 1996. год. и 2000. године [111, 112, 113]. Поједина клиничка испитивања су доказала фреквенцу резистенције на клиндамицин од чак 44% [114]. Са великим повећањем преваленце резистенције на клиндамицин, и узимајући у обзир његова нежељена дејства која могу бити веома озбиљна, постоје дилеме око избора овог лека посебно у лечењу бактеријских вагиноза, где је преваленца резистентних сојева знатно већа него код третирања истих метронидазолом.

Табела 4.1. Механизам резистенције метронидазола

Микроорганизми	Механизам резистенције
Анаеробне и микроаерофилне бактерије	<p>Инактивација метронидазола продукцијом <i>nim</i> гена.</p> <p>Гени одговорни за резистенцију ових врста бактерија су изоловани из плаزمида ових бактерија и названи ним гени. Трансфер ових гена на одговарајуће реципијенте повећава резистенцију на метронидазол мада механизам и функција <i>nim</i> гена није тачно објашњена. Откривено је да <i>nim</i> гени садрже шифру 5-нитроимидазол редуктазе која конвертује 5-нитроимидазол у нетоксични аминоксид дериват чиме елиминише цитотоксични ефекат овог лека [115, 116].</p>
	<p>Непознат механизам алтерације у флаводоксин или хидрогеназу.</p> <p>Студије резистенције метронидазола на ове врсте бактерија су утврдиле да двосмерна хидрогеназа <i>C. plasteurantium</i> има критичну ензимску улогу у редукцији метронидазола феродоксин везаним механизмом. Гени који контролишу активацију лека код друге врсте клостридија су доказани и показују високу осетљивост на метонидазол и то они гени који носе шифре за флаводоксин и хидрогеназу. Ови протеини служе као електрон донори за активацију лека. Флаводоксин из клостридије је показао да је способан да замени феродоксин који је обично носач електрона [117, 118, 119].</p>
	<p>Инактивација <i>rdxA</i>: редукција или неактивирање у резистентним хелијама.</p> <p>Редукција-активности пирувата: флаводоксин оксидоредуктазе или α-кетоглутарат редуктазе?</p> <p>Механизам резистенције хеликобактерије укључује 1) смањење преузимања лека; 2) смањење активације метронидазола; 3) модификација циљног места; 4) повећање ДНК репарације.</p> <p>Инактивација рецА, гена потребног за репарацију ДНК, повећава осетљивост хеликобактерије на метронидазол. Постоје докази да експресија овог гена повећава резистенцију <i>E-coli</i> на метронидазол. Посебну улогу у резистенцији на метронидазол имају метаболички ензими посебно пирувати - феродоксин, флаводоксин, оксидоредуктаза (POR) и α-кетоглутарат оксидоредуктаза (KOR). Активност ових ензима је смањена код резистентних сојева. Последњи радови су доказали да инактивација гена названог <i>rdxA</i> који садржи кодове за NADPH нитроредуктазу је главни узрок резистенције на <i>Helicobacter pylori</i> [120, 121].</p>
Анаеробни паразити	<p>Смањење или измена пируват феродоксин оксидоредуктазе</p> <p>Ове врсте резистентних бактерија имају дефицит у пируват феродоксин оксидоредуктази која има главну улогу у активацији метронидазола, преузимањем електрона са метронидазола и стварањем цитотоксичног слободног радикала облика овога лека [122, 123, 124].</p>

Микроорганизми	Механизам резистенције
<i>Entamoeba histolytica</i>	<p>Нема промене или повећања нивоа ПФО и активности? Смањење флаводоксина 1 и флавин редуктазе?</p> <p>Молекуларна основа резистенције није јасна, мада се повезује са резистенцијом ове протозое не еметин, која је условљена експресијом гена за трансмембранске протеине чија је улога да испумпавају лек из ћелије. Како <i>Entamoeba</i> и <i>Giardia</i> не поседују хидрогенозоме, активација метронидазола се дешава у цитоплазми преко електронског трансфера компонената <i>PFO</i> и <i>FD</i> који су ту смештени. Улога ових протеина није потпуно јасна у механизму резистенције. Спектофотометријском анализом <i>PFO</i> код резистентних ћелија утврђено је повећање њихове активности у овим ћелијама [125, 126].</p>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	<p>Смањење хидрогенозомалног феродоксина неопходног за активацију метронидазола.</p> <p>Механизам активације метронидазола код ове врсте паразита је исти као код претходних врста са једином разликом што се ови биохемијски путеви одвијају у специјализованим органелама које се зову хидрогенозом. Када лек уђе у органелу, почиње процес активације који укључује трансфер електрона са хидрогенозомалних протеина пирувата (<i>PFO</i> и <i>FD</i>) на нитро групу метронидазола преведећи га у цитотоксичну форму (Слика 2.3.). Механизам резистенције се заснива на две могуће хипотезе: 1) дефицит феродоксин протеина у резистентним изолатима и 2) смањен ниво феродоксин протеина као последица мутације у феродоксин генима [127, 128, 129].</p>
<i>Trichomonas foetus</i>	<p>Смањење хидрогенозомалног феродоксина неопходног за активацију метронидазола.</p> <p>Механизам резистенције исти као код <i>Trichomonas vaginalis</i> [130].</p>

Секундарни метаболити виших биљака (пре свега ароматичних биљака) су се показали као алтернативно и перспективно решење, како у превенцији контаминације воде и хране (природни и нешкодљиви конзерванси) [14], тако и као снажни антимикуробни агенси у лечењу патогених обољења људи, нарочито због чињенице да не постоје докази о резистенцији бактерија на етрска уља, пре свега због свје комплексне структуре [131].

4.3. ЕТАРСКА УЉА

4.3.1. Биљке као потенцијални извор антимикробних материја

Употреба биљака и њихових продуката као антимикробних агенаса датира још из далеке прошлости. Људи са свих континената имају дугу историју употребе антимикробних биљних препарата у профилактичке и терапијске сврхе. Постоје докази да су неандерталци живећи пре 60000 година на територији данашњег Ирака користили биљку *hollyhock*, која се и данас широко употребљава у етномедицини као антибактеријско средство [132].

Постоје подаци да на планети земљи живи 250000 до 500000 биљних врста [133]. Само мали део овог биљног богатства, 1% до 10% се користи за исхрану, а незнатно више у медицинске сврхе [134]. Хипократ, праотац савремене медицине, је у 4. веку пре нове ере помињао 300 до 400 биљака које се користе као лековита средства [135]. У првом веку наше ере Диоскоридес је написао Материју Медику (*De Materia Medica*), медицински биљни каталог који је постао прототип савремене фармакопеје. Чак и Библија у себи поседује опис око 30 лековитих биљака. Падом старих цивилизација уништени су бројни докази и документа о биљним врстама употребљиваним у медицинске сврхе. Северна Америка је имала дупле стандарде у употреби биљака у медицинске сврхе, једне које су прокламовали Индијанци и чији су корени још у праисторији, и друге који су потицали од европљана и доживели посебан развој у 19. веку. Стари Индијанци су користили 1625 биљних врста у исхрани, а 2564 у медицинске сврхе, што је забележено и сачувано у документима које је забележио Моерман (према његовим прорачунима, остало је 18000 врста које нису биле испитане и нису се користиле.) [136, 137].

Међу европљанима постојао је велики отпор примени конвенционалног начина лечења. Oliver Wendell Holmes је записао да медицински третмани почетком деветнаестог века могу бити опасни и неефективни. Све ово употпуњује употреба живиних купки у берберским салонима Лондона, за лечење сифилиса и опасних халуциногена у терапији туберкулозе [138].

Као реакцију на запостављање употребе биљака у медицинске сврхе, група алтернативних лекара је издала каталог 1887. године под називом *Homeopathic Pharmacopoeia of the United States*.

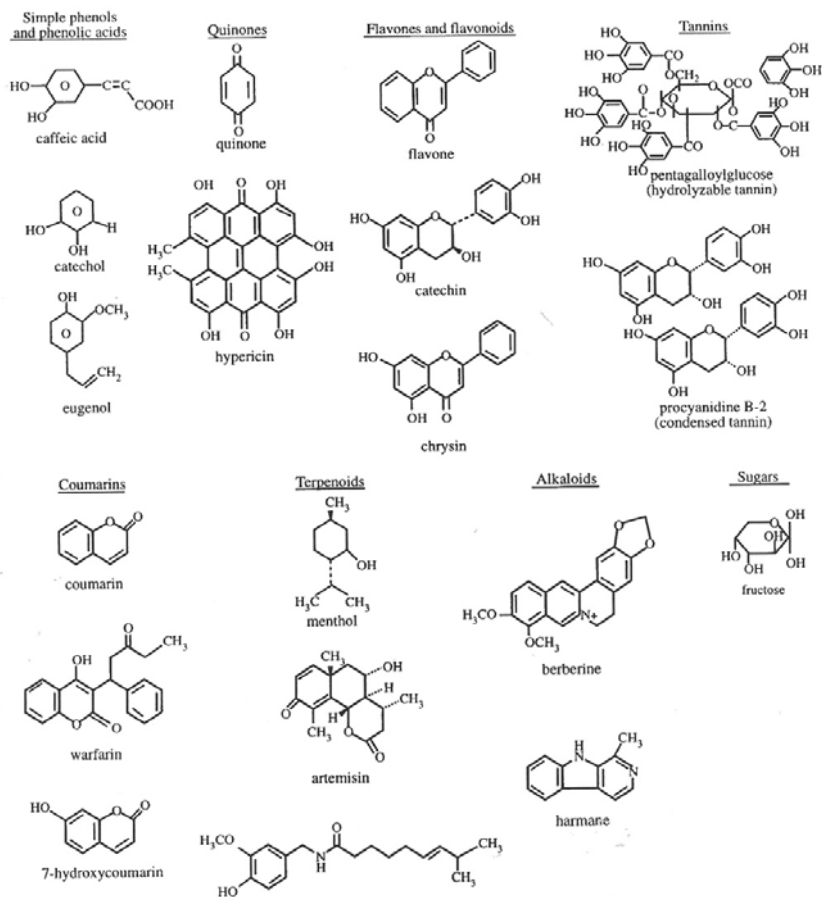
Откриће антибиотика 50. тих година двадесетог века ставља употребу биљних препарата у антибактеријске сврхе у историју, и потпуно запоставља овај вид борбе против инфективних агенаса. Међутим, сведоци смо да се последње две деценије савремена медицина све више ослања на традиционалну или се комбинује са овим видом лечења, јер су све чешћи случајеви резистенције и толеранције на конвенционалне антибиотике. Други разлог за обновљени интерес за биљна антибактеријска средства је огромно повећање броја биљних врста. Постоји научна дисциплина названа етнофармакологија (*ethnopharmacology*), чији су циљеви да прикажу знања и научно потврде деловање биљних и животињских продуката на очување људског здравља [139, 140, 141]. Етнофармакологија је све више у

експанзији, проучавањем лековитог дејства најразличитијих биљних и животињских дрога и њихове употребе у терапијске сврхе, ослањајући се великим делом на традиционалну медицину и њена знања [132]. Посебно интересантна последњих година су испитивања анти ХИВ биљних производа, за које је доказано да имају значајно дејство, што би било посебно погодно за терапију ове болести у неразвијеним земљама које имају проблем да обезбеде скупу терапију какву захтева ова болест [140].

Постоје бројни разлози због којих су клинички микробиолози заинтересовани за биљне антибактеријске супстанце. Научници из целог света, из разних научних области, испитују биљке са посебном пажњом на њихово антимикуробно дејство. У последњих неколико деценија изоловано је и истражено хиљаде фитохемикалија које су имале инхибиторно дејство на микроорганизме *in vitro*. Поред фармаколошких, воде се и опсежне токсиколошке студије, и прате нежељена дејства фитотерпије, као и утицај ових супстанци на цео организам људи и животиња. Опсежна истраживања се врше и у области биоинжењеринга, а састоје се у експресији ензима који учествују у једном од два биосинтетска пута, у циљу повећања садржаја и побољшања квалитета етарског уља [141]. То само говори колики је неистражени потенцијал у оквиру лечења прородним биљним препаратима чиме би се могли превазићи бројни проблеми са којима се тренутно сусреће савремена конвенцијална медицина.

Велики је изазов стандардизовати методе екстракције за одређене групе фитохемијских супстанци, као и *in vitro* методе тестирања, како би истаживања била систематска, као и приказ резултата релевантан. Процењено је да око 40% лекова води порекло од секундарних метаболита [132]. Ово би било посебно значајно са аспекта превентиве инфективних болести, јер би тако добили значајне резултате у одржавању нормалне микрофлоре организама употребом оваквих препарата, као и са аспекта антимикуробне терапије природним, ефикасним препаратима који нису ископромитовани као многи хемотерапеутици до сада употребљавани у антимикуробној терапији. Све ово указује на значај употребе биљака и њихових деривата, у фармацеутској индустрији у намери да се нађу нове активне антибактеријске супстанце, па је зато проучавање ових потенцијално природних лекова од велике важности и у експанзији.

Најкорисније фитохемијске супстанце које имају антибактеријско дејство су феноли и полифеноли, хинони, флавоноли, флавоноиди и флавоноли, танини, кумарини, терпеноиди и етарска уља, алкалоиди, лецитини и полипептиди, микстуре и друге супстанце [132].



Слика 4.2. Структуре уобичајених антибактеријских биљних састојка

У следећој табели дате су фитохемијске супстанце подељене у категорије и спектар њиховог антимикубног дејства.

Табела 4.2. Механизам антибактеријског дејства биљних састојка

Класа	Субкласа	Примери	Механизам	Референце	
Феноли	Прости феноли	Катехол	Ензимска инхибиција оксидацијом субстрата	142	
		Епикатехин	Оштећење мембране	143	
	Фенолна киселина	Циметна киселина		144	
	Хинони	Хиперицин	Везују се за атхезин, комплекс са ћелијским ѕидом и инактивирају ензиме	145	
	Флавоноиди	Хризин	Везују се за атхезин, комплекс са ћелијским ѕидом и инактивирају ензиме	146, 147	
	Флавоноли	Тотарол	?	148	
	Танини	Елагитанин		Везују се за протеине	149
				Везује се за атхезин	150
				Инхибирају ензиме	151, 152
				Стварају комплекс са ћелијским ѕидом	

Класа	Субкласа	Примери	Механизам	Референце
			Оштећују ћелијску мембрану	
			Стварају комплексе са металима и јонима	
	Кумарини	Варфарин	Интеракције са ДНК (антивирусна активност)	153, 154
Терпеноиди, етарска уља		Капсицин	Оштећење ћелијске мембране	155
Алкалоиди		Берберин	Умеће се у ћелијски зид ДНК и ремети структуру	156, 157
		Пиперин		
Лецитин и полипептиди		Маноза специфични аглутинин	Блокира вирусну апсорпцију	158, 159
		Фабатин	Формира дисулфидне везе	

Полифеноли и феноли су фитохемијска једињења најједноставније грађе који у свом саставу садрже фенолни прстен супституисан различитим хемјским групама. Циметна и кофеинска киселина су најтипичнији представници ове групе, деривати фенилпропионске киселине и имају велики оксидациони потенцијал. Кофеинска киселина којом је богат тимијан је ефикасна против вируса, бактерија и гљивица [160, 161, 162]. Катехол и пирогалол су се показали такође веома ефикасна антимикуробна средства и представљају хидроксилисане феноле, катехол са две ОН групе и пирогалол са три. Сматра се да положај и број хидроксилних група има утицаја на антибактеријску активност, и доказано је да феноли са више група показују већу токсичност према микроорганизмима [163,164,165]. Механизам антибактеријског дејства фенола укључује енимску инхибицију ових оксидованих једињења, кроз реакције са сулфхидрилним групама бактерија или неспецифичне реакције са њиховим протеинима. Фенолна једињења која имају бочни угљеников низ на ароматичном прстену састављен од С₃ атома који не садржи кисеоник, са малим оксидационим потенцијалом припадају етарским уљима, и типичан представник је еугенол присутан у етарском уљу каранфилића, који има бактериостатско дејство против гљивица и бактерија [166, 167].

Хинони су представници фитохемијских супстанци са две наспрамне кето групе на ароматичном прстену. Присутни су свуда у природним супстанцама и веома су реактивни. Ова врста једињења су одговорна за браонкаст изглед пресеченог воћа и поврћа, и представљају интермедијерно једињење у синтези меланина у хуманим ћелијама [168]. Њихов редокс потенцијал је веома важан у многим биохемијским процесима, коензим Q10 и витамини К (његово антихеморагијско дејство се везује за ову особину) [169]. Захваљујући богатству слободних радикала од стране ових једињења, хинони поседују огроман антибактеријски потенцијал, чији се механизам дејства огледа у стварању иреверзибилних комплекса са нуклеофилним аминокиселинама у протеинима, што доводи до њихове инактивације и губитка функције [170]. Циљно место за везивање хинона за бактеријску ћелију механизмом адхезије су полипептиди ћелијског зида и езними везани за бактеријску мембрану. Хиперицин, антрахинон садржан у кантарионовом уљу, има доказано антидепресивно дејство, али такође постоје радови који потврђују његово антибактеријско дејство [166].

Флавони, флавоноиди и флавоноли су полициклична једињења која имају једну карбонил групу. Флавоноиди су хидроксилисане фенолне супстанце које имају

C₃-C₆ везу за ароматични прстен. Обзиром да се зна да се флавоноиди синтетишу у биљкама као одговор на бактеријску инфекцију, постоје радови који *in vitro* доказују њихово антибактеријско дејство на велики број микроорганизама [171]. Механизам дејства флавоноида се објашњава стварањем комплекса између молекула флавоноида и екстрацелуларних и солубилних протеина ћелијског зида бактерија, слично механизму дејства хинона. Веома липофилни флавоноиди такође могу оштетити бактеријску мембрану [172]. Катехин, флавоноид који се налази претежно у зеленом чају, има посебну пажњу, јер је доказана антибактеријска активност овог флавоноида *in vitro* на *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutants*, *Shigella*, и друге бактерије [173, 174, 175, 176]. На основу ових истраживања, урађена је студија где се експерименталним мишевима давао 0,1% катехински чај, и каријес изазван *S. Mutants* је редукован на 40 % [177]. Флавоноиди као хризин, глициризин су показали изузетно антивирусно дејство, посебно против ХИВ вируса [178].

Танини су група полимерних фенолних једињења који имају заједничку особину адстригенције. Налазе се у свим деловима биљака и деле се на две групе: хидролизоване и кондензоване танине. Хидролизоване танине се базирају на галној киселини, обично њени мултипли естри са Д-глукозом, док кондензоване танине су деривати мономера танина или настају полимеризацијом хинонских јединица. Посебну пажњу су привукли последњих година, када је доказано да њихово дејство у зеленом чају и црном вину које је превентивно у односу на многе болести [179]. Постоје бројне студије које доказују њихово антитуморско, фагоцитно, антиинфективно деловања [180, 181, 182]. Механизам антимикробног дејства се заснива на инактивацији микробних адхезина ћелијског зида, инактивацији ензима, комплексом са полисахаридима [183].

Кумарини су фенолне супстанце, настале фузијом бензена и алфа пирон прстенова. Они дају сени карактеристичан мирис. Од 1996. год идентификовано је 1300 врста ових једињења и доказано њихово антиинфламаторно, антитромбоцитно и вазодилаторно дејство [184]. Варфарин, је добро познати представник ове групе, антикоагулант [185]. За кумарине се зна да су јако токсични за глодаре, па им је примена у медицинске сврхе веома опрезна [186]. Постоје докази упркос томе да кумарини могу бити безбедно елиминисани урином из хуманог организам. Постоје радови који доказују антифунгицидно и антибактеријско дејство разних врста кумарина [187]., али је ова група једињења још у разматрању када је њихова примена као антибактеријских агенаса у питању.

Алкалоиди су хетероциклична азотна једињења. Први медицински примењен алкалоид је морфин, 1805. год, и име је добио о грчком богу сна *Morpheus*. [188]. Кодеин и хероин су деривати морфина. Дитерпеноидни алкалоиди изоловани из биљака фамилије *Ranunculaceae* показују значајно антимикробно дејство [189]. Глукоалкалоид из фамилије *Solanaceae* показује анти-Хив дејство као и анти бактеријско дејство. Иако показују значајно бактерицидно дејство (*Giardia i Enatmoeba* врсте), ипак му је примарно антидиароичко дејство [190]. Сматра се да је њихов механизам дејства ометање синтезе ДНК, мада није поуздано доказано [191].

Лецитини и полипептиди су група позитивно наелектрисаних једињења која садрже дисулфидне везе. Њихово антимикробно дејство је први пут доказано 1942.год [192]. Механизам антибактеријског дејства ових једињења се објашњава формирањем јонских канала на микробној мембрани, или компетитивном инхибицијом адхезије бактеријских протеина за полисахаридне рецепторе [193, 194]. Амарантус је њихов представник познат још из давнина по антибактеријском дејству, док у скорије време највише пажње се придаје анти ХИВ дејству ових

једињена [195]. Фабатин, изолован из једне врсте пасуља, показао је инхибицију *E.colli*, *P.aeruginosa*, *Enterococcus*, али није имао утицаја на *Candidu* [196]. Ова група једињења са аспекта етнофармакологије заслужује велику пажњу, јер постоје бројни радови који указују на њихов велики антимикуробни и фармаколошки потенцијал [197].

Miksture - најпростији пример ове групе једињења су штапићи за жвакање који у неразвијеним афричким земљама служе за одржавање денталне хигијене. Ови штапићи се праве од различитих биљних врста које у себи садрже једињена различите структуре и дејства, која синергистички дају антимикуробни ефекат [198].

Латекс од биљке папаја, њен млечни сок, представља антибактеријску смешу разних врста једињена (алкалоида, терпеноида..) који имају бактериостатско дејство [199]. Прополис представља микстуру различитих биљних једињена, терпеноида, флавоноида, естара и бензоеве киселине, супституисаних фенолних киселина и естара [200]. Његово антибактеријско и антивирусно дејство је више пута доказивано [201]. Међутим, пре употребе микстуре морају бити испитане и стандардизоване, јер међу бројним фармаколошким супстанцама може бити и значајних количина токсина.

Друге супстанце, као што су моносахариди, фруктоза у соку од бруснице, доказано имају антибактеријску активност [202]. Популарност у антибактеријском дејству ове биљке, заправо лежи у садржају моносахарида фруктозе који компетитивно инхибира адсорпцију патогене *E.colli* од стране епителних ћелија дигестивног тракта. Многе клиничке студије доказују антибактеријско дејство ових моносахарида у брусници, боровници, а истражује се и присуство других једињена која доприносе овако значајном антибактеријском дејству ове биљке [203].

Постоје бројни већ поменути научни докази који потврђују снажно антимикуробно дејство биљака фамилије *Lamiaceae* (жалфија, оригано, тимијан), и знатно мање фамилије *Ariaceae* (ким, коријандер, коморач). У даљем раду ћемо се бавити испитивањем антимикуробног дејства секундарних метаболита (етарских уља) поменутих биљака (жалфија, оригано, тимијан, ким, коријандер, морач, еукалиптус), као потенцијалних антимикуробних агенаса.

4.3.1.1. Жалфија (*Salvia officinalis*)



Жалфија (*Salvia officinalis*), ароматична, медоносна и лековита, једна је од најстаријих медицинских биљака. Сам назив жалфије *Salvia* на латинском потиче од речи салваре, што значи спасити, излечити, јер су је још стари Римљани веома користили у лечењу разних болести, а *officinalis* значи лековит. На енглеском реч за жалфију “sage“ означава мудрост, а користили су је за стимулисање концентрације, за повећање памћења, а сматра се да доприноси и дуговечности. Лековите особине имају само листови богати угљеним хидратима, целулозом, танинима и беланчевинама. Осим ових органских једињења, садрже и много гвожђа и калцијума, а богати су и витамином А. Ипак, најважнији лековити састојак ове биљке је њено етарско уље. Осим етарског уља (1,5-2%) лист жалфије садржи око 3% флавоноидних хетерозида, фенол-карбонских киселина (рузмаринска) и танина. Нису без значаја ни горке материје (дистерпенска једињења).

Због таквог садржаја лист жалфије спречава инфекције (бактериостатик), опушта грчеве у мишићима (спазмолитик), одстрањује гасове (карминатив), обезбеђује површинско скупљање ткива (адстрингенс), ублажава прекомерно знојење (антихидротик), подстиче процесе разарања и везивања неугодних мириса (дезодоранс). До открића антибиотика, чај од жалфије је коришћен код упала грла, ждрела, промуклости, упала унутрашњих органа, за вагинална испирања, код туберкулозног знојења, гљивичних инфекција.

Званична медицина је прихватила индикације за употребу препарата жалфије с обзиром на то да су засноване на дугогодишњој традиционалној употреби:

- биљни лек (благи диспептик) за третман прекомерног лучења киселине и отклањање болова, горушице и надутости
- биљни лек (антихидротик) за ублажавање проблема прекомерног знојења
- биљни лек за симптоматску терапију упалних процеса слушкоже уста и ждрела
- биљни лек за симптоматску терапију мањих упалних процеса на кожи.

4.3.1.2. Тимијан (*Thymus vulgaris*)



Тимијан (*Thymus vulgaris*), обични тимијан или само тимијан најпознатија је биљка из рода тимијана, којих има пет врста а најпознатије врсте су *obični timijan* (*Thymus vulgaris*) и мајчина душица (*Thymus serpyllum*). Обични тимијан (*Timus vulgaris*) има шест хемотипова, према главним активним компонентама у њему: тимол, линалол, карвакрол, транстујенол-4, α -терпинеол/терпенил-ацетат и гераниол/геранил ацетат, а познати су још и хемотипови *p*-цимен, лимонен и 1,8-цинеол. Хемотип је иста врста биљке, која у зависности од места раста, даје етарска уља различитог хемијског састава и, наравно, различитог деловања. У Грчкој се палио на олтарима и у кућама као заштита од заразних болести, Египћани су га употребљавали у процесу балзмовања, ценили су га Хипократ, Плиније Старији и Хилдегард из Бингена. Грци су га користили у својим купатилима и палили га у својим храмовима. Њиме су конзервисали воће и вино, а коришћен је и као пчелиња паша за производњу мирисног и лековитог меда. У Средњем веку тимијан се пуно користио за зачињавање хране због заштите од труљења, а због снажног антисептичког деловања, био је добро антисептичко средство у болницама. Тако је тимијан од обичне традиционалне биљке прерастао у дрогу која се широко користи у савременој фитотерапији.

Основно дејство етарског уља је да је снажан антисептик (спречава раст и развој микроорганизама). У интерној примени тимол делује као снажан вермицид (средство против глиста и ларви), посебно ефикасан против врсте *Ancylostoma duodenale* и *Necator americanus*. Такође етарско уље делује и као бронхоспазмолитик и експекторанс, па се и због свог антибактеријског дејства користи за лечење упала

горњих дисајних путева. Немачка комисија за лекове је и званично одобрила интерну употребу ове биљке за лечење бронхитиса и катра горњих дисајних путева (Bronhicum®). Тимол, монотерпенски састојак тимијана, је изврстан конзерванс. Због свих наведених лековитих својстава Чешка је одлучила да искаже почаст тимијану и прогласила га је својим националним цветом.

4.3.1.3. Оригано (*Origanum vulgare*)



Оригано (*Origanum vulgare*) или дивљи мајоран, зачинска је и лековита биљка. Назив биљке потиче из грчког језика (грч. орос – брдо, ганос – накит), преко италијанског оригано -брдски накит. Оригано садржи до 3% етарског уља (само уље садржи 40 % фенола), нешто мање од 1% флавоноида, слободне алкоhole, танине.

René-Maurice Gattefossé, отац модерне ароматерапије, увидео је још пре сто година како је етарско уље оригана богато групом једињења која се зову феноли, веома слична синтетском фенолу који се широко користио као антисептик и антимикуробни агенс у то време. Синтетски фенол, који се данас сматра токсичном супстанцом и чија је употреба у медицинске сврхе избачена, био је нашироко коришћен у XIX веку. Користио се за дезинфекцију рана, гангрене и као такав наносио на ткиво које је третирано фенолом. Занимљиво је да је управо захваљујући фенолима изолована прва ДНК, поступак који је темељ данашње молекуларне биологије и истраживања нових лекова. Изоловао ју је швајцарски научник Friedrich Miescher на свеучилишту у Tübingenu из гнојних рана пацијената с гангреном. Тај стари поступак изолације ДНК, уз неке модификације, задржао се све до данашњих дана.

Данас знамо да су два главна антимикуробна агенса у етарском уљу оригана: карвакрол и тимол. Ови природни феноли су далеко мање штетни од синтетског фенола, а имају антибактеријско деловање слично фенолу. René-Maurice Gattefossé је у својим делима "Propriétés bactéricides de quelques huiles essentielles" (Бактерицидна својства неколико етарских уља) и "Antiseptiques essentiels" (Есенцијални антисептици) нагласио управо деловање етарских уља с фенолима и њихову употребу у разним инфективним болестима. Међутим, управо у то време пронађени су први антибиотици, сулфонамиди (лек Пронтосил, 1935), па је употреба етарских уља попут оригана полако пала у заборав. У то време био је незгодан и начин примене етарских уља оралним путем, јер фармацеутска технологија није досегнула развој олеокапсула, а мање се знало и о другим начинима формулисања етарских уља.

Са појавом резистенције на конвенционалне антибиотике вратила се идеја коришћења фенолних уља попут оригана (једног од омиљених уља светски признатих ароматерапеута попут Kurt Schnaubelta, Daniel Péroëla и Dominique Vaudouxa). Етарска уља задржавају јаку антибактеријску активност чак и против тзв. мултипло резистентних микроорганизама. Користи се код уринарних бактеријских инфекција, вирусних и бактеријских инфекција, горњих респираторних путева, инфекција *Candidom*, ХПВ и тежих облика херпес инфекција, инфекција уха грла и носа, акутних и хроничних синуситиса, *Helicobacter pylori* и других инфекција... Уље оригана садржи рузмаринску киселину, која је снажан антихистаминик и моћнији

антиоксиданс од витамина Е. Рузмаринска киселина најчешће се користи у лечењу алергијских реакција.

4.3.1.4. Морач (*Foeniculum vulgare*)



Морач (*Foeniculum vulgare*) једна је од најстаријих лековитих биљака коју су користили стари Египћани, Римљани и Грци најчешће код тегоба са варењем и прехладе, али и осталих здравствених сметњи. Ароматично семе гајеног коморача слаткастог је укуса и веома пријатног мириса и садржи чак око 6% етарских уља (анетол, фенхон и терпен). Лековито етарско уље добија се дестилацијом семенки, а препоручује се за унутрашњу употребу због антиспазматичног дејства које ублажава колике, код опстипације, регулише пробаву.

4.3.1.5. Ким (*Carum Carvi*)



Ким (*Carum carvi*) или дивљи кумин, кимин, кумин питоми ким, пољски ким спада у најраспрострањеније, најстарије и најомиљеније зачине света. Ким садржи 3-7% етарског уља (*oleum carvi aetheroleum*), од чега преко 65% карвона, којег има и у уљима мирођије и кумина, и око 30% терпена лимонена. Ким је стомахик, спазмолитик, карминатив, холагог, аперитив, еменагог, експекторанс, као и благ антимикуробни агенс. Етарско уље кима подстиче рад желуца и жучи, умирујуће делује на црева, смирује грчеве и истерује гасове. Уље спречава развој бактерија у цревима које ометају правилно растварање хранљивих састојака и узрокују настанак различитих отрова у цревима.

4.3.1.6. Коријандер (*Coriandrum sativum*),



Коријандер (*Coriandrum sativum*), чији је народни назив: живица, коријандер, паприца се такође широко користи. Етарско уље се добија дестилацијом из семена и чине га 70% монотерпена, 10% кетона, естри и кумарини. Захваљујући овим посебним састојцима етарског уља које садржи, коријандер помаже у правилном излучивању ензима и пробавних сокова. Неки елементи етарских уља поспешују правилан рад јетре и црева. Делотворан је и код дијареје узроковане бактеријама и гљивицама, будући да неки састојци имају антибактеријска својства.

4.3.2. Антибактеријске ароматичне биљне супстанце

Биљке имају скоро неограничену способност да синтетишу ароматичне супстанце разних фармаколошких активности, међу којима феноли и терпени заузимају најзначајније место. Већина ових супстанци су секундарни метаболити, где је изоловано око 12000 различитих једињења разних хемијских структура (феноли, терпени, танини, флавоноиди, алкалоиди...) која представљају само 10 % од укупног броја једињења садржаних у ароматичним биљкама [204].

Медицинско дејство биљака је карактеристично за одређене биљне врсте и њихове секундарне метаболите који имају специфична фармаколошка дејства. За разлику од примарних супстанци (угљени хидрати, липиди, протеин, хлорофи, нуклеинске киселине), које учествују у примарном метаболизму и одговорни су за раст и развој биљне ћелије, секундарни метаболити, међу којима су етарска уља и терпени, имају бројна фармаколошка деловања (антианфламаторно, антибактеријско, антиоксидантно, антидепресивно, анестетско...)

Секундарни метаболизам чине разноврсни процеси у којима се синтетишу једињења специфична за дати тип ћелије. Биљни пигменти, алкалоиди, изопреноиди, терпени, воскови су неки од примера производа секундарног метаболизма код биљака. Улога секундарних метаболита је вишеструка и веома значајна. Наиме, пошто су биљке сесилни организми који не поседују имуни систем, оне су морале да развију изванредан механизам одбране против патогена, као и механизам који ће привући инсекте и остале животиње, важне за њихово оплођење и дистрибуцију семена.

Многи продукати секундарног метаболизма су бактерициди, репелентне супстанце или су чак отровни за штеточине и биљоједи. Извесни секундарни метаболити код биљака имају функцију хормона и учествују у регулацији неких животних процеса.

Секундарни метаболити биљака су, хиљадама година уназад, били познати и коришћени и од стране људи, а посебно етарска уља. У данашње време метаболити биљака се користе директно или након извесних хемијских модификација. Процењено је да око 40% лекова води порекло од секундарних метаболита. Њихова фармаколошка вредност не престаје да добија на значају захваљући сталним открићима и потврдама њихове стварне и потенцијалне улоге у лечењу (антиканцер препарат Тахол.™) [205].

Да етарска уља имају дугу традицију у фармацеутској пракси говори чињаница да је Немачка фармакопеја издата 1926. године, ДАБ 6, садржала монографије 26 етарских уља, У шестом издању Европске Фармакопеје која је издата 2007 год. налази се 27 монографија етарских уља, од чега је 20 етарских уља преузето из ДАБ 6, три уља Британске фармакопеје, 1993.год., и једно из Француске фармакопеје (анис, горки коморач, ким, ловор, кора цимета, цитронела, каранфилић, коријандер, еукалиптус, клека, лаванда, лимун, камилица, нерол, пеперминт, борове иглице, тимјан, рузмарин, мајчина душица; дементолисана нана, мускатни орашчић, слатка поморанџа, цимета, жалфије, мандарина, чајно дрво).

Резултати и тестови фармаколошких испитивања етарских уља су представљени у књизи . „Приручник за Етарска Уља, наука, технологија и примена“, издатој 2010, чији су аутори К. Hüsni. Can Baser и др. покушали да сакупе и испитају информације из научне литературе како би имали увид у варијабилност

параметара тестова, варијације података и значаја ових фактора за интерпретацију добијених резултата.

4.3.3. Хемијска анализа етарских уља

Етарска уља су лако испарљиве комплексне природне смесе угљоводоника, алкохола, карбонилних јединења, меркаптана и других јединења алифатично-ароматичне структуре. Од масних уља се разликују по ароматичности и испарљивости, дају биљкама карактеристичан мирис и представљају секундарне метаболите биљака. Етарска уља и њихове компоненте генерално стадају у сигурне супстанце за коришћење у медицинске сврхе, тзв. ГРАС (*Generally Recognized As Safe*) [204].

Етаска уља су широко распрострањена у биљном свету и нађена су у преко 2000 биљних врста. Тренутно је познато око 3000 етарских уља, од чега је 300 комерцијализовано и широко се употребљава у фармацеутској, агро, прехранбеној, санитарној и козметичкој индустрији [206]. Изузетно богате етарским уљима су врсте фамилија: *Pinaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Apiaceae*.

Етарска уља представљају бистре, лако покретљиве, безбојне или жућкасте течности (изузети су етарска уља камилице и цимета), ароматичног и љутог укуса (изузети су уље аниса и морача која су слатког укуса). Дужим стајањем на ваздуху уља се усмоле, згусну, потамне и реагују кисело. Растварају се веома добро у апсолутном етанолу, хлороформу, етру, масним уљима и другим органским растварачима, у води се скоро не растварају. Етарска уља су оптички активне супстанце, специфичне тезине од 0,84-1,18.

Етарска уља представљају јако испарљиве ароматичне уљасте супстанце, настају у цитоплазми ћелије, и у нормалним условима налазе се у виду сићушних капљица које су лоциране у специјализованим секреторним структурама биљака. Из ароматичних делова биљака (цвет, лист, корен, семе, стабло етц) могу се добити разним методама:

- пресовање (експресија);
- хидродестилација - дестилација воденом паром; водом; водом и воденом паром;
- екстракција помоћу неиспарљивих растварача (уља и масти);
- екстракција помоћу лако испарљивих растварача;
- екстракција гасовима у суперкритичним условима;
- *head space* метода (директно узорковање, поступак по коме се испарљива јединења изузорка директно усмеравају у GC-MS без предходног изоловања) и
- екстракцијом растварачима која је потпомогнута деловањем микроталаса (ЕСАМ).

Међутим за употребу у фармацеутској индустрији највише се користе уља добијена екстракцијом и хидродестилацијом. Количина и квалитет етарског уља

добијена овим методама зависи од климе у којој биљака расте, чврстине биљке, старости, вегетативног циклуса, органа биљке из којих се добија етарско уље [204].

Поред органолептичких особина, основне физичке и хемијске карактеристике на основу којих се утврђује квалитет уља су: густина, индекс преламања, оптичка ротација, растворљивост у алкохолу, интервал кључања, затим киселински и естарски број, садржај алдехида и кетона, фенола, итд. Пошто би се на основу ових испитивања створила општа слика, даљи ток анализе се врси индивидуално, у зависности од случаја.

Анализа етарског уља подразумева одвајање појединих компонената, њихову идентификацију и карактеризацију употребом класичних хемијских метода (фракциона дестилација, дериватизација и деградационе реакције). Ове методе су у потпуности потиснуте инструменталним методама анализе које представљају најпоузданији начин утврђивања хемијског састава, а тиме и квалитета етарских уља. Најчешће се за идентификацију и хемотипизацију етарских уља користе гасна хроматографија и масена спектрометрија.

Gasna hromatografija (GC) се показала као јако ефикасна у анализи етарских уља, јер поседује три велике предности у односу на остале аналитичке методе: веома је брза, има добар капацитет раздвајања и веома је осетљива. Такође је и метода избора када располажемо са јако малим количинама етарског уља. Добијени резултати у виду времена задржавања на колони (ретенционог времена t_R) су репродуктивни, а уз подршку рачунарске технике повећана је могућност за идентификацију једињења комбинацијом са масеном спектрометријом (MS). Увођењем јон трап детектора (ИДТ) и ИТМС добија се масени спектрометар са пуним компјутерским могућностима. Да би се одредиле све присутне компоненте у сложеној смеси коју представља етарско уље, често је неопходна употреба више од једне колоне. Енантиселективна гасна хроматографија (употреба хиралне колоне) омогућује испитивање енантиомерног састава хиралних компоненти етарског уља, које могу да послуже као отисак прста при карактеризацији његовог порекла, фенотипа, аутентичности. Доказано је, да је присутност (+)-ментил-ацетата у уљу пеперминта (где је (-)-ментил ацетат, енантиомер који је главни производ) индикација сазревања биљке.

Иако су GC и GC-MS најбоље методе за квантитативну и квалитативну анализу етарских уља, пошто је реч о смешама разноврсних једињења која се одликују разним хемијским и физичким особинама, препоручљиво је да се изведе префракционисање уља колонском хроматографијом на ниским температурама (-20 до -30 °C), фракционом дестилацијом или самом гасном хроматографијом (GC). У обзир долази и анализа на две колоне различитих поларности, као и примена мултидимензионе гасне хроматографије.

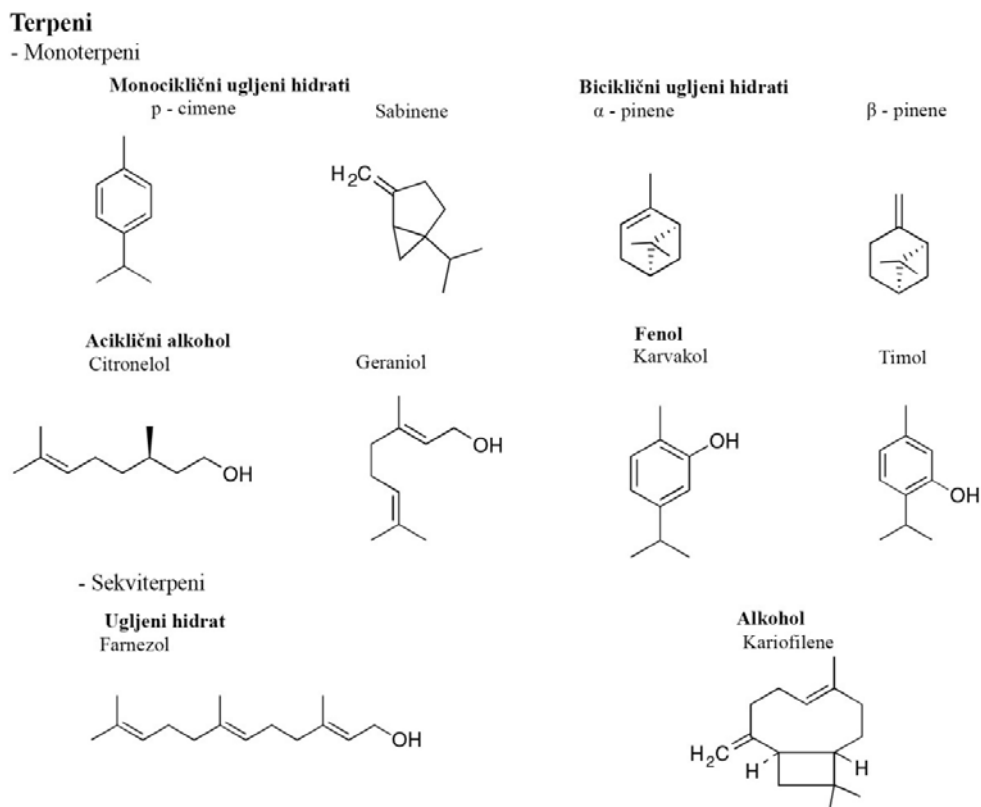
4.3.3.1. Састав етарских уља

Етарска уља су веома комплексне природне микстуре које се састоје од 20 до 60 компонената које су заступљене у различитим концентрацијама [204]. Свако етарско уље карактеришу две до три компоненте, које су заступљене у релативно високој концентрацији (20-70%) у односу на остале компоненте који се налазе у траговима. Ове главне компоненте етарских уља одређују биолошке и

фармаколошке особине самог уља. Тако су карвакол и тимол главне компоненте етарског уља тимијана, док је линалол главна компонента коријандера, ментол и ментон етарског уља менте етц. Компоненте етарских уља садрже две главне групе биосинтетских супстенци [206, 207, 208, 209,210]. Прва група су терпени или терпеноиди, а другој групи припадају ароматицни и алифатицни конститuentи.

Етарска уља су посебно богата једињењима изопренске (C₅) структуре тзв.терпени или терпеноиди, који су одговорни за њихов карактеристичан мирис и укус и разликују се од масних киселина због своје цикличне структуре и екстензивног гранања. Главна група терпена су монотерпени C₁₀ и сесквитерпени C₁₅. Опста хемијска формула је C₁₀H₁₆, и они се јављају као дитерпрни, три терпени и тетра терпени (C₂₀, C₃₀, C₄₀), и као хемитерпени C₅ и сесквитерпени C₁₅. Када терпени у себи садрже јос неки елеменат, најчесце кисеоник, њихов назив је терпеноиди.

Најрепрезентативнија група терпена су монотерпени, настали спајањем две изпоренске јединице, који су у етарском уљу садрзани у концентрацијама до 90% и имају огромну структурну разноликост [204]. У испарљивим фракцијама углавном се налазе нижи монотерпени и једноставнији сесквитерпени, док се полиоксидовани сесквитерпени и дитерпени налазе у теже испарљивим фракцијама и смолама.



Слика 4.3. Хемијска структура компонента етарских уља (шеријана)

Монотерпени обухватају неколико група једињења :

- Угљене хидрате
ацикличне: *myrcene*, *ocimene*, етц.
моноцикличне: *terpinenes*, *p-cimene*, *phellandrenes*, етц.
бицикличне: *pinenes*, *-3-carene*, *camphene*, *sabinene*, етц.
- Алкохоле:
ацикличне: *geraniol*, *linalol*, *citronellol*, *lavandulol*, *nerol*, етц.
моноцикличне: *menthol*, *a-terpineol*, *carveol*
бицикличне: *borneol*, *fenchol*, *chrysanthenol*, *thuyan-3-ol*, етц.
- Алдехиде:
ацикличне: *geranial*, *neral*, *citronellal*, етц.
- Кетоне:
ацикличне: *tegetone*, етц.
моноцикличне: *menthones*, *carvone*, *pulegone*, *piperitone*, етц.
бицикличне: *camphor*, *fenchone*, *thuyone*, *ombellulone*, *pinocamphone*, *pinocarvone*, етц.
- Естре :
ацикличне: *linalyl acetate* or *propionate*, *citronellyl acetate*, етц.
моноцикличне: *menthyl* or *a-terpinyl acetate*, етц.
бицикличне: *isobornyl acetate*, етц.
- Етре:
1,8-cineole, *menthofurane*, етц.
- Пероксиде:
ascaridole, етц.
- Феноле:
thymol, *carvacrol*, етц.

Сесквитерпени се састоје од следећих група једињења:

- Угљени хидрати:
azulene, *b-bisabolene*, *cadinenes*, *b-caryophyllene*, *logifolene*, *curcumenes*, *elemenes*, *farnesenes*, *zingiberene*, етц.
- Алкохоли:
bisabol, *cedrol*, *b-nerolidol*, *farnesol*, *carotol*, *b-santalol*, *patchoulol*, *viridiflorol*, етц.
- Кетони:
germacrone, *nootkatone*, *cis-longipinan-2,7-dione*, *b-vetinone*, *turnerones*, етц.

- Епоксиди:
caryophyllene oxide, humulene epoxides, етц.

Примери биљака које садрже ове компоненте су бергамот, ким, целер, цитронела, коријандер, еукалиптус, геранијум, лаванда, лимун, мандарина, поморандза, пепрминт, бор, рузмарин, жалфија, клека, тимијан.

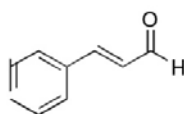
За разлику од терпена, ароматична једињења се налазе у знатном мањем саставу од терпена у етарским уљима. Потичу од фенилпропана, и њихова биосинтеза се одвија засебно од биосинетзе терпена, и код неких биљака ароматична једињења представљају доминантне компоненте (цимет, каранфилиц, коморац, етц).

Ароматична једињења су деривати фенилпропана и мање су присутни у етарским уљима од монотерпена. Најчешће су присутни у етарским уљима аниса, першуна, цимета, коморача, и неких биљака фамилија *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Ariaceae*. Ова група једињења обухвата:

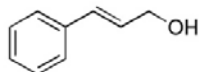
- Алдехиде: циннамалдехуде
- Алкоhole: циннамиц алцохол
- Феноле: цхавицол, еугенол
- Метокс деривате: анетхоле, елемицине, естраголе, метхулеугенолс
- Метилен диоксид једињења: апиоле, муристицине, сафроле

Ароматична јединjenja

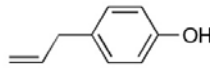
Алдеhid
Cinamaldehyd



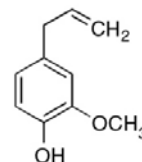
Алкохол
Cinamil alkohol



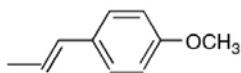
Фенол
Kavikol



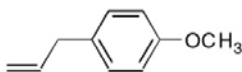
Фенол
Eugenol



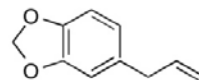
Метокси дериват
Anetol



Метокси дериват
Estragol

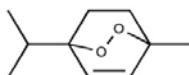


Метилен диоксид јединjenja
Safrol

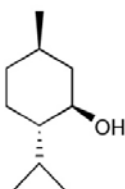


Terpenoidi (Izoprenoidi)

Askaridol

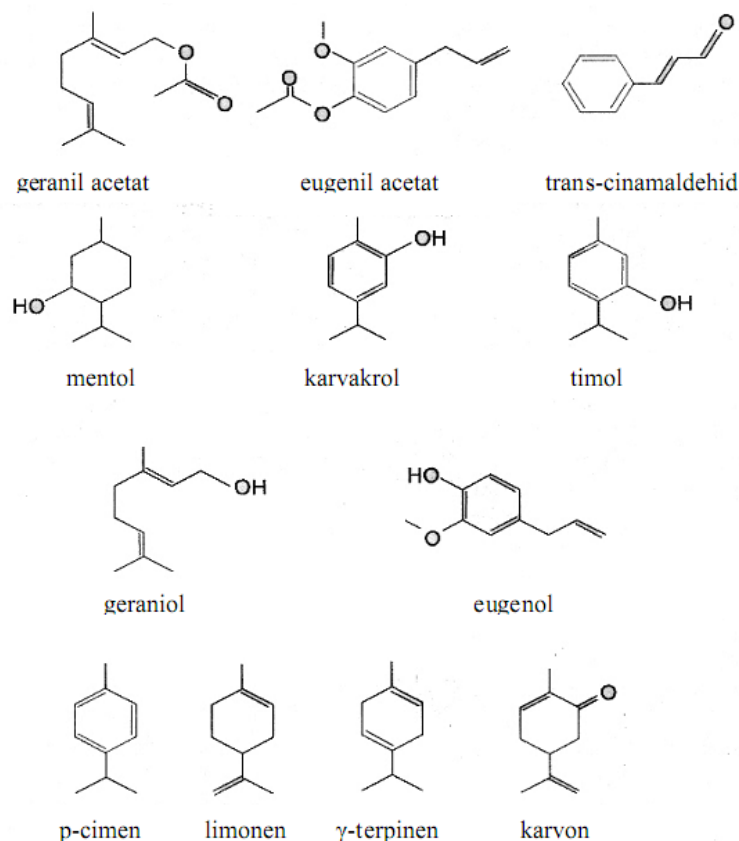


Mentol



Слика 4.4. Хемијска структура неких ароматичних компонента етарских уља

Посебно место када је антибактеријско дејство у питања, имају етарска уља ароматичних биљака, где спадају биљке фамилије *Ariaceae* (ким, коријандер, коморач) и нарочито фамилије *Lamiaceae* (матичњак, оригано и тимијан) [204], чије су структурне формуле главних антибактеријских компонената дате на слици 4.5.



Слика 4.5. Структурна формула антибактеријских компонената етарских уља фамилије *Lamiaceae*

4.3.3.2. Антимикробна активност етарских уља

За антимикробну активност етарских уља је важна хемијска структура појединих компоненти. Од највећег значаја је липофилни карактер угљоводоничног скелета и хидрофилни карактер функционалних група.

Постоје бројна испитивања о антимикробној активности етарских уља. Једно од највећих су урадили Mogis et al. који су испитали 521 етарско уље и њихове компоненте и открили да 44% испитаних уља инхибира раст најмање једног тестираног микроорганизама (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, етц [211]. У овом испитивању етарска уља фамилије *Lamiaceae* су показала највећу антимикробну ефикасност. Постоје бројна истраживања која доказују дејство ових уља на бактерије *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, бактерије изазиваче вагиналне кандидијазе и БВ. Поред етарских уља и терпени показују значајно антибактеријско дејство. Терпени у овим уљима као цитрал, еугенол, ментол,

карвакол, гераниол, инхибишу раст бактерија и гљивица, и испољавају значајно дејство против паразита.

Терпеноид/бетулинска киселина је један од многих који је показао значајну активност у инхибицији ХИВ вируса [212]. Механизам антибактеријског дејства терпена још није у потпуности познат, али постоје бројне студије које указују да је у питању деловање ових липидних супстанци на ћелијску мембрану бактеријске ћелије. Терпени и терпеноиди су активни против бактерија [213, 214, 215, 216], гљивица [217, 218, 219], и протозоа [220, 221]. На основу бројних студија процењено је да 30 % испитаних етарских уља делују антибактеријски, а 60 % антифунгицидно [222].

Међутим, фенолна једињења која су углавном најзаступљенија компонента етарских уља, показују највећу антибактеријску активност [223]. Када је у питању јачина антибактеријског дејства фенолних једињења положај хидроксилних група не игра битну улогу што би се могло очекивати. То доказује слично антибактеријско деловање карвакола и тимола на *S.aureus* и *P.aeruginosa* [224]. Значај фенолног прстена (систем дестабилисаних електрона) се види у знатно нижој активности ментола у односу на карвакол [225].

Постоје подаци који указују на то да и мало заступљене компоненте играју важну улогу у антимикуробној активности, услед могућег синергистичког деловања са осталим компонентама.

Табела 4.3. Главне компоненте етарских уља које испољавају антибактеријско дејство

Име етарског уља	Латинско име биљке	Главна компонента	Процент садржаја%	Reference
Кориандер	Coriandrum sativum (mladi listici)	Linalool	26%	226
		E-2-decanal	20%	
Кориандер	Coriandrum sativum (seme)	Linalool	70%	226
Симет	Cinnamomum zeylandicum	E-2-decanal	–	227
		Trans-cinnamaldehyde	65%	
Оригано	Origanum vulgare	Carvacrol	Trace - 80%	228
		Thymol	Trace - 64%	229
		g-Terpinene	2 – 52%	230
		p-Cymene	Trace - 52%	231, 232
Розмарин	Rosmarinus officinalis	a-pinene	2 – 25%	233, 234
		Bornyl acetate	0 – 17%	
		Camphor	2 – 14%	
		1,8-cineole	3 – 89%	
		Camphor	6 – 15%	
Залфија	Salvia officinalis L.	a-Pinene	4 – 5%	232
		h-pinene	2 – 10%	
		1,8-cineole	6 – 14%	
		a-tujone	20 – 42%	
		Eugenol	75 – 85%	
Каранфилиц	Syzygium aromaticum	Eugenyl acetate	8 – 15%	235
		Thymol	10 – 64%	
Тимјан	Thymus vulgaris	Carvacrol	2 – 11%	227, 236, 237, 238, 233, 239
		g-Terpinene	2 – 31%	
		p-Cymene	10 – 56%	
		Thymol	10 – 64%	

Табел 4.4. Примейри цийоїоксичної дејсїва неких ейраских уља фамилија *Lamiaceae* и *Ariaceae* на сїандардне микроорїанїзме

EU ili komponente	Mikroorganizmi	Koncentracije	Reference
Eucalyptus robusta	Staphylococcus aureus		241
Eucalyptus saligna	Escherichia coli Candida albicans		
Melissa officinalis	Pseudomonas aeruginosa Escherichia coli Salmonella Sarcina lutea Micrococcus flavus Staphylococcus Bacillus subtilis Trichophyton Microsporum canis Epidermophyton floccosum Candida albicans	20%, 50% MIC 15-30 iL/ml	243
Ocimum basilicum, Origanum vulgare, Thymus vulgaris	13 bacteria 6 fungi	20%, 50% MIC 8-15-30 iL/ml MIC 1-2 iL/ml MIC 2-4 iL/ml	244
Thymus vulgaris, Salvia sclarea, Salvia officinalis, Salvia lavandulifolia, Rosmarinus officinalis, Origanum	Salmonella enteritidis Salmonella typhimurium Escherichia coli Yersinia enterocolitica Candida albicans	MIC <0.1-5.0 iL/ml	245
Carvacrol		0.0625, 0.125, 0.25 mg/ml	247
Calamintha officinalis, Origanum compactum, Rosmarinus officinalis, Salvia aegyptiaca, Thymus glandulosus, a-Pinene, Borneol, Thymol, Carvacrol, Cineole, p-Cimene Linalool, Menthone, R- (+)-Pulegone	Botrytis cinerea	10-250 ppm	248
Thyme, Basil,	Shigella sonnei	0.1-10%	249
Thymol, Estragol,	Shigella flexneri	0.05%	
Linalool, Carvacrol,	Escherichia coli		

EU ili komponente	Mikroorganizmi	Koncentracije	Reference
Coriandrum sativum	Salmonella choleraesuis	6.25 ig/ml	250
volatiles		12.5 ig/ml	
Anethum graveolens,	Corynebacterium diphtheriae	4.50, 0.09, 0.04, 0.02 ig per	251
Carum copticum,	Staphylococcus aureus	filter paper disc agar	
Coriandrum sativum,	Streptococcus haemolyticus	method	
Cuminum cyminum,	Bacillus subtilis	IZ: inactive to 36 mm	
Foeniculum vulgare,	Pseudomonas aeruginosa		
Anethum graveolens,	Escherichia coli	MIC 0.02-0.10-0.47% v/v	226
Coriandrum sativum (seeds)	Salmonella typhimurium	MIC 0.02-0.10-0.47% v/v	
Coriandrum sativum (leaves)	Listeria monocytogenes	MIC 0.01-0.10-0.47% v/v	
Eucalyptus dives and fractions	Staphylococcus aureus	MIC 0.04-0.13-0.43% v/v	
	Pseudomonas fragi		
	Serratia grimesii		
	Enterobacter agglomerans		
	Yersinia enterocolitica		
	Bacillus cereus		
	Group A Streptococcus		
	Lactobacillus		
	Saccharomyces cerevisiae		
Origanum vulgare,	Aspergillus ochraceus	500, 750, 1000 ppm	252
Mentha arvensis,			
Ocimum basilicum,			
Salvia officinalis,			
Coriandrum sativum			
75 essential oils	Aspergillus niger	5 iL/filter paper disc	253
Thymol, Carvacrol	Candida albicans		
21 essential oils of	Escherichia coli	1/1, 1/5, 1/10, 1/20	255
Rosemary, Aniseed,	Bacillus subtilis		
Eucalyptus, Lime, etc.	Staphylococcus aureus		
Thymus eigi	14 bacteria	MICs 0.06, 0.14, 0.28,	256, 257
Origanum vulgare,		4.50, 18.00 mg/ml	
Coriandrum sativum	27 phytopathogenic bacteria	MIK 217.5-6960ig	258
Foeniculum vulgare	Two mycopathogenic species	MIK 480-7680 ig	
Thymus algeriensis	Four bacteria, two fungi, two yeasts	MIC 0.5-1.0iL/ml	259
Myrtus communis	Bacillus cereus	MIC 1.4-11.20 mg/ml	260
Origanum vulgare	Bacillus subtilis	MIC 0.35-0.70 mg/ml	

EU ili komponente	Mikroorganizmi	Koncentracije	Reference
Pelargonium graveolens	Escherichia coli	MIC 0.36-5.60 mg/ml	
Rosmarinus officinalis	Staphylococcus aureus	MIC 1.40-11.20 mg/ml	
Salvia officinalis		MIC 1.40-11.20 mg/ml	
Thymus serpyllum		MIC 0.28-1.40 mg/ml	
Citronellol		MIC 0.35-1.40 mg/ml	
Eucalyptol		MIC 2.80-5.60 mg/ml	
Geraniol		MIC 0.08-1.40 mg/ml	
Thymol		MIC 0.7-1.40 mg/ml	
Carvacrol		MIC 0.35-2.80 mg/ml	
Triacetin		MIC 22.40 mg/ml	
29 essential oils	13 Escherichia coli serotypes	MIC 100-500 ig/ml	261
Foeniculum vulgare (FE)	Alternaria alternata	MIC 1.0-3.0 iL/ml	262
(FE1, FE2, FE3)	Aspergillus niger	MIC 1.0-2.8 iL/ml	
Bifonazol	Aspergillus ochraceus	MIC 0.8-3.2 iL/ml	
Anethole	Aspergillus versicolor	MIC 7.0-15.0 iL/ml	
Fenchone	Aspergillus flavus	MIC 1.3-2.2 iL/ml	
Camphor	Aspergillus terreus	MIC 3.7-5.8 iL/ml	
	Cladosporium cladosporioides	MIC 2.8-6.0 iL/ml	

Напомена: MIC: минимална инхибијорна концентрација, MBC: минимална бактерицидна концентрација, ED: ефективна доза, EC: ефективна концентрација, IC: инхибијорна концентрација, IZ: зона инхибиције, MFC: минимална фунгицидна концентрација, MIK: минимална инхибијорна колицина

Антимикробна активност компонената етарских уља расте од фенола, преко алдехида, кетона, алкохола, етара, угљоводоника [263].

Постоје бројни докази који потврђују претпоставку да се састав и антимикробна активност етарског уља исте врсте варирају у зависности од годишњег доба на различитим географским локалитетима [264, 236, 265]. Истарживања потврђују и податак да етарска уља, која се формирају током или одмах након цветања, имају највећи антимикробни ефекат [236, 238, 266]. Такође, различиту антимикробну активност показују уља из различитих делова исте биљке. Етарска уља из семена кориандера (*Coriandrum sativum* L.) имају другачији састав од етарских уља из листова исте биљке [226].

Етарска уља су оптички активне супстанце., и то тако да су два енантиомера обично присутна у различитим биљкама (+) алфа пинен у *Pinus pinasteru* и (-) бета пинен у *Pinus silvestrisu*. (-) линалол у коријандеру и (+) линалол у камфорном дрвету, (-) енантиомери су карактеристични за етарска уља геранијума и руже, док рацемска смеша је цитронелол. Различити енантиомери показују различиту антимикробну активност. (-)-пинен је активнији од енантиомера (+)-пинена према 18 од 25 испитаних различитих бактеријских сојева и према две од три филаментне гљиве [267].

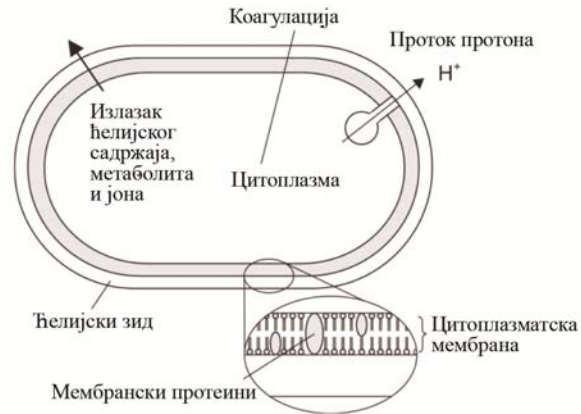
4.3.4. Механизам антимикубног деловања етарских уља

Постоје бројне теорије које објашњавају механизам антимикубног дејства етарских уља. Захваљујући бројним компонентама из којих се састоји одређено етарско уље, антибактеријска активност се објашњава специфичним реакцијама које имају више циљних места на бактеријској ћелији [268, 269, 14]. Обзиром да су етарска уља секундарни метаболити биљака, реагују са многим бактеријским целуларним компонентама и могу модулисати циљна места за која се везују и тако оштетити бактеријску ћелију [270]. Најчешћи механизми дејства су везани за циљна места као што је ћелијска мембрана, електронски транспорт, јонски градијент, протеинска транслокација, фосфорилација и друге ензимски зависне реакције [207, 20]. Хеландер ет ал. су показали да тимол из етарског уља тимотијана и карвакрол из оригана, оштећују ћелијску мембрану и тако смњују интрацелуларни "АТФ pool" и повећавају екстрацелуларни "АТФ pool" код *E. coli* [271].

Етарска уља као хидрофобне материје имају велики афинитет за липиде бактеријске ћелијске мембране, и њихово антибактеријско дејство се најчешће везује за њихов липофилни карактер.

Дорман анд Деанс су приметили да се овај механизам антибактеријског дејства заснива на липофилним особинама конституената етарских уља и њиховим функционалним групама [20].

Међутим, нека истраживања су показала да фенолна једињења, тимол и карвакрол, такође инхибирају раста Грам негативних бактерија механизмом оштећења ћелијске мембране [206]. Доказано је да су конституенти етарски уља мале молекуле, веома мале молекулске масе, па као такве могу проћи и кроз спољашњи омотач Грам негативних бактерија [272, 20]. Монотерпени линалил ацетат, ментол и тимол имају активност против Грам-позитивне *Staphylococcus aureus* и Грам-негативне *E. coli*, и указују да је антибактеријски механизам ових једињења везан за оштећење плазма мембране бактерија, чиме нарушавају интактност мембране и долази до цурења садржаја бактеријске ћелије и њене лизе [273].



Слика 4.6. Механизми антибактеријског дејства етарских уља на бактеријску ћелију (242)

Доказано је да дејство етарских уља на бактеријску ћелију зависи од стадијума развоја ћелије, најосетљивије су у фази деобе (вероватно етарско уље продире на месту деобе ћелије) [13]. Поред тога доказано је и интензивно дејство етарских уља (захваљујући њиховој липофилности) на оштећење митохондријалне мембарне, што доводи до дефекта респираторног система и смрти бактеријске ћелије [280]. Митохондрије, кроз електрон транспортни ланац мењају електронски проток, производе слободне радикале који оксидују и оштећују липиде, протеине и ДНК. Овај механизам дејства је завистан од повећања концентарције следећих јона у ћелији -Fe, Cu, Zn, Mg или Mn. [282, 283, 284]. Овај механизам прооксидантног дејства етарских уља, које има негативне ефекте за бактеријску ћелију, може бити веома значајан у позитивном смислу искоришћења његовог антиоксидантног дејства у медицинске сврхе. Постоје бројне студије, које показују прооксидантно дејство конституената етарских уља, посебно полифенола, као веома ефикасних у смањењу локалних тумора, некроза и апоптоза [285, 286, 287, 288].

Подаци о проучавању деловања уља добијеног из чајног дрвета на *E. coli* показују да смрт може наступити и пре лизе ћелија [289].

Овако снажна антимикуробна активност етарских уља против патогених бактерија се заснива пре свега на високом проценту фенолних компонената као што су карвакрол, еугенол (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol) и тимол [189, 20, 239, 190, 290, 249]. Њихов механизам деловања је сличан деловању осталих фенолних једињења: реагују са цитоплазматском мембраном изазивајући њене лезије и промену пермеабилности, што резултује у промени мембранског потенцијала, АТП-пула, интрацелуларне рН средине, тј. рН-градијента и ефлуку Na^+ јона [291, 292, 293]. Неки терпеноидни молекули са функционалним групама попут фенолне, алкохолне и алдехидне делују на протеине мембрана умањујући или потпуно инхибишући њихову активност [274]. Етарско уље цимета и његове компоненте инхибишу аминокиселинске декарбоксилазе код *Enterobacter aerogenes* и спречавају синтезу протеина [294]. Етарска уља могу спречити синтезу протеина патогених и у млеку, што се може искористити у прехранбене сврхе као конзерванс [295]. Доказано је да етарска уља могу инхибирати ензиме бактерија у експерименту са АТП-азама које су уроњене у липидни двослој цитоплазматске мембране. Предпоставља се да испитана етарска уља делују једним од два предложена

механизма: а) липофилни молекули се акумулишу у липидном двослоју и доводе до дисторзије у липидно-протеинским интеракцијама; б) могућа је и директна интеракција липидних компоненти са хидрофобним деловима протеина [296, 292].

Осим тога што етарска уља врше инхибицију раста вегетативних бактеријских ћелија она врше и инхибицију продукције токсина. Студије су показале да етарска уља неких биљака смањују патогеност *L. monocytogenes* (редукујући продукцију листериолизина О и фосфатидилхолин-специфичну фосфолипазу Ц), као и патогеност *S. aureusa* (редукујући продукцију α -тохина и ентеротоксина А и Б) [297, 298].

Као и антибиотици и етарска уља могу довести до инхибиције синтезе ДНК, РНК, протеина и полисахарида бактеријских и фунгалних ћелија [299, 148].

Сара Бурт[14]. је приметила да су Грам позитивне бактерије осетљивије на дејство етарских уља од Грам негативних. Такође, постоје бројне друге студије у којима је доказана већа осетљивост Грам позитивних бактерија на дејство етарских уља[300, 301, 302, 178, 297, 26, 238, 239, 303, 304, 305, 306, 231, 190, 307, 19, 308, 309]. Већа отпорност Грам негативних бактерија на дејство етарских уља и њихових конституената се објашњава тиме што Грам негативне бактерије поседују још једну мембрану око пептидогликанског дела ћелијског зида [14, 310].

Доказано је да је најмање осетљива од свих испитаних бактерија на дејство етарских уља *P. aeruginosa* [311, 312, 313, 189, 314, 303, 20, 305, 315, 308, 316]. Објашњење за ову чинејницу лежи у хидрофилности површине њене мембране, кроз коју могу да продју мали и хидрофилни молекули, док хидрофобни молекули (попут компонената етарских уља) остају на спољној страни мембране [272].

Веома је значајан податак, да до сада није откривена резистенција или толеранција на етарска уља. Ово се објашњава великом комплексношћу њихове структуре која условљава да етарска уља делују на више циљних места у исто време. Ову чињеницу је делимично пореметило истраживање које указује на резистенцију *Bacillus cereus* на карвакол. Међутим, касније је утврђено да се заправо ради о појави резистенције након смањења садржаја карвакола на сублеталну концентрацију. Механизам резистенције на карвакол се објашњава променом липидног састава и структуре ћелијске мембране бактерије [207]. Примећено је и повећање толеранције *Pseudomonasa aeruginosa* на уље чајевца [317], што се објашњава променама у структури баријере и енергетским функцијама ћелијског зида [280]. Отпорност на уље чајевца, смањило је осетљивост ових бактерија и на антибиотике, јер су промене у мембарни бактеријске ћелије условиле да ни примењени антибиотик више није препознавао циљно место на мембрани бактеријске ћелије [317]. Све ово указује, да би код неких инфекција прво антибиотцима требало кренути терапију, па тек онда користити фитотерапеутска средства.

4.3.4.1. *In vitro* њестџови антимикробне активностџи

За испитивање антимикробне активности етарских уља углавном се користе две стандардне методе (које прописује “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS)) са извесним модификацијама:

- диск-дифузиони метод и
- дилуциони метод

NCCLS метод за антимикробно тестирање антибиотика је делимично модификован за анализу етарских уља [17, 318, 319]. Те модификације се односе на метод екстракције етарских уља из биљака, волумен инокулума, фазе бактеријског раста, врсте медијума за гајење, рН медијума, дужине и времена инкубације [320]. Због свега тога је компарација добијених резултата веома компликована [321, 322], посебно ако узмемо у обзир чињеницу о великој испарљивости етарских уља, слабој растворљивости и великој комплексности њиховог састава.

Табела 4.5. Методе за испитивање антибактеријске активностџи етарских уља [14].

Поступак	Метод	Референце:	
Скритринг антибактеријске активности	Диск-дифузиони метод	21, 190, 229, 302, 305, 307, 316	
	Метод бунарића	20, 297, 303	
Одређивање јачине антимикробног деловања	Агар-дилуциони метод	17, 228, 296, 302, 308, 313, 316	
	Бујон(<i>broth</i>)-дилуциони метод	Видљиви раст	19, 21, 189, 306
		ОД/турбидитет	190, 207, 229, 301
		Абсорбанца	297
		Колориметрија	323, 324
		Кондуктанца, Кондуктивност, Импенданца	26, 238, 325, 326
Бројање вијабилних ћелија	17, 229, 325, 327, 328, 329		
Одређивање брзине и трајања антибактеријске активности	Време смрти / Крива презивљавања (<i>Time kill analysis/Survival curves</i>)	190, 229, 308, 324, 325, 327, 330	
Проучавање физиолоских процеса код бактерија	Инхибиција спорулације	331, 332, 333	
	Инхибиција продукције токсина	15, 225, 302, 334	
Проучавање физичких ефеката антибактеријске активности	Електронска микроскопија (СЕМ)	190, 324, 335	

Резултати добијени овим методама називају се *antibiogrami*. Они се не могу у потпуности екстраполирати на живе организме у којима су присутни другачији услови него у хранљивом медијуму. Ипак, ова испитивања су неопходна, и користе

се као прелиминарна, јер само оне супстанце које показују изразито деловање *in vitro*, има смисла испитивати у *in vivo* условима.

Диск-дифузиони метод се базира на употреби целулозних дискова (са аплицираним етарским уљем) који се постављају на инокулисани агар у петри кутији. Ретко се користе концентрована етарска уља [336]. Обично се на дискове наносе раствори етерских уља у различитом разблажењу [337]. Узорак дифундује са места наносења у подлогу радијално у свим правцима. Ширина зоне инхибиције (инхибициони пречник) сразмерна је степену осетљивости микроорганизама на примењени агенс. Након инкубације термостатирањем на 37 °C у трајању од 24-48 часова, резултати се вреднују мерењем пречника зоне инхибиције раста микроорганизама у mm или cm. Уколико нема зоне инхибиције, значи да је микроорганизам отпоран на дејство испитиване супстанце. Ако су услови потпуно стандардизовани (састав и дебљина подлоге, величина инокулума, рН подлоге, време инкубирања, итд.), пречник зоне инхибиције је пропорционалан логаритму концентрације испитиване супстанце.

Поред испитиваног етарског уља у тестирању њиховог антимикуробног дејства неопходно је користити две врсте контроле: позитивну и негативну. Негативна контрола подразумева да се на диск уместо етарског уља наноси или вода или растварач којим је уље разблаживано, док позитивна контрола укључује примену стандардних антибиотика специфичних за испитивање микроорганизама.

Метода бунарића у којој се уља наносе у отворима (који су уз помоћ апликатора издубљени у агару) такође може бити коришћена као прелиминарна скрининг метода [338, 20].

Резултати испитивања антибактеријске активности се изражавају као минимална инхибиторна концентрација (МИК), минимална бактерицидна концентрација (МВС) као и вредности за бактериостатску и бактерицидну концентрацију испитаног етарског уља (дефиниције дате у табели 4.5).

Табела 4.6. Термини који се уједињено користе у тестирању антибактеријске активности [14].

Термин	Дефиниција у односу на концентрацију етарског уља	Референце
Минимална инхибиторна концентрација (МИК)	Најнижа концентрација која изазива тренутну редукцију видљивих ћелија у тестираном узорку	339
	Најнижа концентрација која комплетно инхибише раст тест културе након 48h.	340
	Најнижа концентрација која инхибише видљиви раст трст сојева микроорганизама.	17, 19, 341, 342
	Најнижа концентрација која смањује видљивост инокулума за >90%	189
Минимална бактерицидна концентрација (МВС)	Концентрација која убија више од 99.9% ћелија почетног инокулума	189, 339
	Најнижа концентрација која не даје видљиви раст након субкултивације у свежи медијум	341, 342, 343, 344

<i>Бактериостатичка концентрација</i>	Најнижа концентрација која не даје видљив раст у бујону 297 али долази до појаве колонија након субкултивације на агару.
<i>Бактерицидна концентрација</i>	Најнижа концентрација која не даје видљиви раст у бујону и 297 не долази до појаве колоније након субкултивације на агару.

Ипак најшире прихваћена дефиниција за MIC је - *најнижа концентрација која инхибише видљиви раст шестираних сојева микроорганизама*, а за MBC је - *концентрација која убија више од 99,9% ћелија иочейној инокулума* (добива се на основу броја пораслих колонија након субкултивације на плочастом агару) [319].

Брзина бактерицидног ефекта или трајање бактериостатског ефекта може бити одређена уз помоћ криве преживљавања (*time-kill analiza*) где се, у течном медијуму, прати смањење броја варијабилних ћелија (након наношења етарског уља) током времена. Број се одређује или мерењем ОД или бројањем колонија.

4.4. DRUG DELIVERY SYSTEM ЗА ВАГИНАЛНУ ПРИМЕНУ

4.4.1. Анатомија и физиологија вагине која условљава вагинални *drug delivery*

Вагина је веома важан део репродуктивног система и служи као потенцијални пут примене разних врста лекова за локалну, као и системску примену. Састоји се од чврстог мишичног канала, дугог око 7,5 cm, који се протеже од материце до излаза спољних гениталија. Смештена је између ректума, бешике и уретре. Довољну еластичност, обзиром да нема перисталтику, вагини обезбедјује њена попречна грађа. Вагинални зид се састоји од 3 слоја: епителног, мишићног и *tunica adventitia*.

Замена епителних ћелија, 7-15 слојева, врши се просечно сваких 7 дана, и дебљина епитела зависи од старости (различиту дебљину имају бебе, девојчице, одрасле жене и жене у менопаузи). Дебљина епитела зависи и од хормонског статуса жене, вагинални епител повећава своју дебљину и најдебљи је у пролиферативној фази, када у току овулације достиже највећи садржај глукогена, и нагло опада у касној предменструалној фази. Како се концентрација естрогена смањује у предменопаузи, и менопаузи, долази и до перманентног смањења гликогена у вагиналним епителним ћелијама, и смањења дебљине вагиналног епитела. Поред ових промена, смањење концентрације естрогена у каснијој доби живота жене, доводи и до смањења ширине интрацелуларних канала, рН вредности вагине, секреција... [345]. Промене у ензимској активности (ендопептидазе и аминоксептидазе), придружене хормонским променама могу додатно компликовати примену вагиналног *drug delivery* система у смислу постизања константне терапијске концентрације у току примене лека у једнодозном облику. Количина вагиналне течности је такође ограничавајући фактор при формулисању *drug delivery systema* јер се и она мења са годинама. Одрасла жена има просечно 2 - 3 gr/24 h вагиналне течности, и њена количина се са годинама смањује. Ово се мора узети у обзир, јер

волумен течности утиче на вагиналну апсорпцију. Активна супстанца се мора претходно растворити да би била апсорбована. Густа цервикална течност, која је присутна код жена у менопаузи услед смањења количине вагиналне течности, може представљати баријеру приликом вагиналне апсорпције лека, исто као што ни превелика количина течности није пожељна, јер би тако дошло до разредјивања дозе и непрецизне терапије. Вагина је такође карактеристична по својој специфичној микрофлори, рН и цикличним променама, као и бројним другим факторима који се морају узети у обзир када се развија и испитује вагинални *drug delivery system*.

4.4.1.1. Вагинална апсорпција

Физиолошки фактори као што су цикличне промене, дебљина и порозност епитела вагине, вискозитет и рН вагиналне течности у битној мери одређују апсорпцију активне супстанце из одређеног фармацеутског облика, а самим тим и ефикасноист терапије. Међутим, и физичко хемијске карактеристике самог лека, молекулска маса, липофилност, јонизација су веома битни за вагиналну апсорпцију [346]. Лековита супстанце може бити транспортована кроз вагиналну мембрану трансцелуларно, интрацелуларно или везикуларно и преко рецептора транспортним механизмима [346].

4.4.2. Drug Delivery системи за вагиналну примену

Анатомска позиција, велика апсортивна површина и добра васкуларизација представљају велики изазов за израду вагиналних *drug delivery* система. У бројним студијама је приказана одлична пермеација великог броја једињења, укључујући пептиде и протеине [347, 348, 349, 350]. Вагинални пут апликације лека представља огроман изазов за апликовање многих лекова: бромкриптин, пропранолол, окситоцин, калцитонин, хумани хормон раста као и бројни други хормонски лекови, укључујући и контрацептивна средства. И поред ових предности вагинални *drug delivery* системи имају бројна ограничења на своме путу, управо због анатомске и физиолошке комплексности вагине.

До сада је вагина углавном разматрана за употребу локалних *drug delivery* система са антибиотицима, антимикотицима, антивиротицима, антиинфламаторним лековима, спермицидним агентима, као и са простагландинима и стероидима. Последњих година посвећује се пуно пажње формулисању микробицида, вагиналних *drug delivery* система који би спречили преношење сексуално преносивих болести, попут AIDS-а. [351].

Већина комерцијалних антибактеријских препарата за вагиналну употребу, као и сама етарска уља, немају задовољавајућа мукоадхезивна својства, услед чега нису довољно дуго у контакту са вагиналном мукозом, где би требали да испоље своје фармаколошко дејство.

Обзиром, да до сада примењиване форме вагиналних препарата имају одређена ограничења (цурење и кратко контактено време са мукозом), јавила се потреба за изанлажењем нових препарата, мукоадхезивних *drug delivery* система који могу превазићи досадашње недостатке тренутно употребљаваних конвенционалних

вагиналних лекова и тиме задовољити потребе пацијената у првом реду. При формулацији вагиналних лекова, треба водити рачуна о специфичној анатомији, физиологији, микрофлори и секреторној функцији вагине. Супротно од научних података, само неколико вагиналних *drug delivery* система је нашло примену у пракси.

У току три последње деценије улажу се велики напори у формулисање адекватних вагиналних *drug delivery* система базираних на мукоадхезивним полимерима, који ће омогућити дуже контактено време лека и мукусне мембране вагине, и тако омогућити продужено дејство и одржавање терапијске концентрације лека примењеног у једној дози дневно.

Поред *inserata*, као *drug delivery* система обложених активниом супстанцом, који се примењују интравагинално, *hidrogeli* представљају још једну групу мукоадхезивних система који имају продужено контактено време. Ови полимери се везују за мукусну мембрану, брзо бубре у воденој средини и показују контролисано отпуштање лека. Терапеутски ефекат лека зависи од његове мукоадхезивности. При формулацији ових система, треба узети у обзир да ови препарати реагују са вагиналном течностима и мењају њен вискозитет. Ове интеракције зависе од врсте макромолекула који се користе као гелирајући агенси код израде гела, или од врсте помоћних супстанци, ако су у питању вагиналне таблете. Због свега претходно изнетог, највише се препоручују макромолекули попут полиакрилата, деривате целулозе, хитозана као подлоге за израду мукоадхезивних вагиналних система.

На основу претходно наведених чињеница, очекује се да ће се у оквиру ових испитивања развити оптимални мукоадхезивни систем на бази микрочестица хитозана са инкапсулираним етарским уљем, који ће имати контролисано и циљно отпуштање биоактивне супстанце, у нашем случају етарског уља тимотијана чије смо антибактеријско дејство претходно доказали и утврдили.

4.4.3. Мукоадхезивни полимери са аспекта вагиналне примене лека

Мукус представља веома вискозни, заштитни омотач који прекрива површину органа и штити их од контакта са спољном средином. Мукус је микстура великих гликопротеина (муцин), воде, електролита, епителних ћелија, ензима, бактерија, бактеријских продуката, и других материја чији садржај зависи од извора и локализације мукуса. Постоји неколико механизма којима се објашњава мукоадхезија између биолошких површина, у нашем случају вагиналног епитела, и мукоадхезивних полимера [352, 353, 354]. Мукоадхезија представља верзију биоадхезије, јер је циљно место везивања полимера мукозна мембрана органа, односно вагине. Вагинална мембрана се углавном сматра мукозном мембраном иако нема пехарасте ћелије и директно стварање и ослобађање муцина. Муцин је негативно наелектрисан захваљујући слободним остацима салицилне киселине на дугом угљоводоницином ланцу. Вагинална мукоза је микстура неколико компонената, трансудата епитела, цервикалног мукуса, ољуштених епителних ћелија, секретаријата цервикалних жлезда, леукоцита, ендометријалне и тубусне течности [355, 356].

Вагина је циљно место за *drug delivery* системе на бази многих активних супстанци, и постоје бројна истраживања на том пољу. Лекови се излучују и везују за вагинални епител, мада и само постојање цервикалне мукозе даје алтернативне

путеве за нове *drug delivery* системе.

Постоје бројна истраживања биоатхезивних вагиналних *drug delivery* система. Сви ови системи су изграђени од биоатхезивних полимера, за које је заједничко да имају велику молекулску масу и хидрофилне функционалне групе.

Први вагинални препарат овог типа је формулаисан са циљем да се третирају бактеријска и гљивичне инфекције и инфламација [357]. Обзиром да системска терапија данас наилази на проблеме посебно када су у питању третмани гљивичних и бактеријских вагиналних инфекција, ефикасан топикални препарат ове намене би имао изузетну корист. Бомбарт је формулисао и патентирао вагиналну купку са антибактеријском дејством, која је била веома ефикасна у третману вагиналних гљивица [358]. Купка је имала средства за пенетрацију и садржала биоадхезивни полимер (полиакрилат) који је омогућавао адхезију за вагинални епител и довољно дуго деловање антимикуробног средства. Ghelardi и сардници су дизајнирали мукоадхезивни поликарбофил у коме је инкорпориран еконазол, и који је био веома ефикасан у третирању вагиналне кандидијазе код миша [359].

Метронидазол, је лек избора у терапији бактеријске вагинозе, али фармацеутски облик и доза у којој ће бити апликован још увек нису усаглашени међу многим стручњацима. Лејоуеих је тестирао поликарбофил биоатхезивне вагиналне таблете метронидазола, у експерименту са крављом вагином *in vitro*, и оралне таблете дате пацијентима *in vivo*. Након 1. и 4. недеље праћена је ефикасност обе терапије на узрочнике бактеријске вагинозе, и није запажена значајна разлика, сем што су дозе вагинално примењеног лека биле мање [360].

In situ полксамер гел који садржи клотримазол је тестиран у терапији вагиналне кандидијазе [361]. Праћено је продужено ослобађање овог антимикотика *in vitro* и *in vivo* и утврђено да у овој форми котримазол показује значајно продужено дејство, и ефикасан је у терапији вагиналне *C.albicans*. Ово указује на чињеницу да употребом ових полимера можемо имати ефикасану терапију и смањити дозни интервал, односно имати препарат са продуженим дејством који ћемо само једном дневно примењивати [362]. Међутим, развој вагиналног гела Crinone® са продуженим ослобађањем прогестерона, је представљао прекретницу у приступу израде топикалних препарата за вагиналну примену. Студија спроведена на 345 жена код којих је овај вагинални гел примењен једном или два пута дневно, је показала исту терапијску ефикасност овог гела као и интрамускуларни препарат овог лека, и чак већу ефикасност у поређењу са Utrogest® капсулама [363, 364, 365]. Већина ових студија је извођена са полиакрилатима као полимерним супстанцама где се њихова мукоатхезивност повећава увођењем цистеина у њихов молекул када настају тиоловани полиакрилати који имају бољу ефикасност. Овако се најчешће примењују хормони пептиди и полипептиди као и инсулин у последње време [366, 367, 368, 369, 370].

Супротно полиакрилатима који представљају синтетске супстанце, све више се пажње посвећује употреби носача активних супстанци природног порекла. Често се као мукоадхезивни носач користи хитозан изолован из шкољки морских рачића и других морских љускара [371]. Захваљујући инкапсулацији жељени активни састојци могу да се имплементирају у различите фармацеутске производе. Ови инкапсулирани облици омогућују стабилност и очуваност лако испарљивих етарских уља.

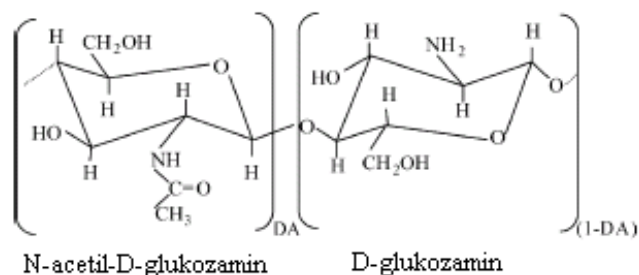
Хитозан се користи у разним формулацијама, гели, таблете, пудери, емулзије... Хитозан има мукоадхезивну и антибактеријску активност при

физиолошким рН вредностима [372, 373]. Поред тога хитозан има способност за поновљену адхезију јер се полимер не инактивира после првог контакта са мукозном површином. Увођењем тиолних група у молекул хитозана повећава се његова мукоадхезивност, и задржава биодеградибилност што је од изузетне важности. Модификација хитозана у још мукоадхезивнију форму је веома важна карактеристика са терапијског аспекта у третирању инфекција мукозних мембрана, каква је БВ, увођењем тиогликолне киселине у полимер и реакцијом са аминоксислужинама полимера, при чему се стварају чврсте амидне везе. Како хитозан и сам поседује антимикуробна својства [374, 375], увођење тиолне групе ствара идеалан носач за антимикуробне супстанце, јер су такви полимери способни да стварају ковалентне везе са цистеином из мукуса, чиме се омогућава продужено контактено време између полимера и мукозне мембране, а самим тим и ресорпција апликованог препарата. На овај начин би добили мукоадхезивни систем са контролисаним ослобађањем активне супстанце идеалан за третирање бактеријских вагиноза и њихових изазивача, као и *Candida albicans*.

4.4.3.1. Хитозан

Хитозан је угљени хидрат, који се добија из шкољки морских рачића и других морских љускара, као што је *Pandalus borealis*.

Хитозан је природни полиаминосакхарид, дериват хитина, добијен његовим *N*-деацетиловањем (слика 4.7.). Хитин је један од најраспрострањенијих органских супстанци у природи и улази у састав шкољки, љускара, скелета инсеката и ћелијског зида гљива којима даје чврстоћу и стабилност. Добија се у великим количинама и по релативно ниским ценама из остатака морске хране у индустријским процесима. Хемијски, хитин се састоји од β (1 \rightarrow 4) повезаних 2-ацетоамидо-2-деокси- β -Д-глукозних јединица или *N*-ацетил-Д-глукозамина стварајући дугачки линеарни полимер нерастворан у већини растварача [376].



Слика 4.7. Структура хитозана

Хитозан, основни дериват хитина, добија се алкалним деацетиловањем хитина при чему од степена деацетиловања зависе и његове кисело-базне особине и растворљивост. Он је заправо хетерополимер састављен од *N*-ацетил-Д-глукозамина и Д-глукозамина, при чему степен деацетиловања комерцијалног хитозана најчешће износи од 70-90 % (слика 4.8.).



Слика 4.8. Добијање хитозана

Хитозан поседује јединствене хемијске и биолошке карактеристике. Он је линеарни полиглукозоамински ланац велике молекулске масе нерастворан у води. Поседује реактивне amino и хидроксилне групе, које се могу релативно лако хемијски модификовати и на тај начин омогућити ковалентно везивање биолошки активне компоненте под благим условима. Захваљујући великом броју хидроксилних група које садржи показује изражено хидрофилни карактер. Са друге стране, amino групе чине хитозан катјонским полиелектролитом ($pK_a \approx 6,5$), и један је од неколико пронађених у природи. Amino групе хитозану дају јединствене карактеристике: растворан је у киселим воденим растворима ($pK_a < 6,5$) и када је растворен поседује позитивно наелектрисане amino групе које пријањају за негативно наелектрисану површину, због чега ствара агрегате са полианјонским једињењима или хелатне комплексе са јонима тешких метала. Обе ове карактеристике, растворљивост у киселим воденим растворима и агрегација са полианјонима чине хитозан подложним гелирању. Хитозан има и посебне биолошке карактеристике: биокомпатибилност, биоразградљивост на безопасне продукте, нетоксичност, физиолошку инертност, велики афинитет према протеинима, као и антитуморну и антифунгалну активност. Сва ова својства дају огроман потенцијал хитозану за примену у разним областима [368].

Биомедицинска примена хитозана је веома широка. Због својих позитивних својстава све више се користи у системима за контролисано отпуштање природних биоактивних супстанци и синтетских лекова. Amino група хитозана има pK_a вредност $\sim 6,5$, што хитозан чини позитивно наелектрисаним и растворљивим у киселим до неутралним срединама. Ово хитозану даје својства биоадхезивности и омогућава везивање за негативно наелектрисане површине, као што су мукозне мембране. Хитозан побољшава транспорт поларних лекова преко епителијалних површина. Битна својства хитозана су и његова биокомпатибилност и биодеградибилност [369].

4.4.3.2. Хитозан као носач биоактивних сујстјанци за вагиналну примену

Приликом дизајнирања система намењених вагиналној испоруци лекова, микробни полисахариди попут алгината, хитина, хитозана и декстран сулфата су привукли већу пажњу због своје нетоксичности, биодеградибилности, осетљивости на pH вредност и мукоадхезивних својстава. Употреба ових микробних полисахарида у биотехнологији испоруке лекова је нарочито важна зато што је терапијска примена макромолекула повезана са неким озбиљним проблемима, посебно кад је у питању вагинална администрација. Као прво, велика молекулска

тежина хитозана за резултат има ограничену дистрибуцију преко биолошких баријера и ниску биорасположивост. Друго, пептиди, протеини, олигонуклеотиди и гени су нестабилна једињења која треба да буду заштићена од деградације у биолошком окружењу (ниска рН вредност у вагини.) Према томе, постоји још доста нерешених питања да би могао да се осмисли ефикасан систем за вагиналну испоруку лека који поседује висок капацитет носивости, продужено време циркулације, способност акумулације у траженим патолошких локацијама, за испоруку хидрофилних и липофилних макромолекула.

Да би се у овоме успело, систем за испоруку лека мора да обезбеди заштиту у киселим условима у вагини и да буде довољно мали да омогући блиску везу са површином вагиналног епитела, те да циљ лека буде вагинална мукоза како би се појачала ресорпција лека или се продужило време задржавања лека у вагини због биоадхезије.

Због своје јединствене катјонске полимерне структуре, способности формирања гела и мукоадхезивности, хитозан је један од у истраживањима веома коришћених микробних полисахарида носилаца за вагиналну испоруку лабилних макромолекулских једињења. Испоставило се да позитивно наелектрисани хитозан може снажно да веже негативно наелектрисан материјал, као што је површина ћелије или слузокожа. Поред тога, он је у стању да смањи трансепителни електрични отпор и накратко створи чврсте везе између ћелија епитела, омогућавајући на тај начин пренос макромолекула лека кроз добро организован епител [357]. Увођењем тиолних група у хитозан, модификовање хитозана са тиогликолом киселином која се везује за аминок групе полимера амидним везама, значајно се повећавају мукоадхезивне особине а да се при томе задржава биодеградибилност [370].

На основу тога обављен је велики број *in vitro* и *in vivo* студија да би се истражила употреба хитозана као носиоца за циљну испоруку лека [371, 372, 373, 374, 375].

Микробни полисахариди (MPS) нуде значајне предности као што су ниска токсичност, биокомпатибилност, биоразградљивост и свестраност облика (прах, гел, куглице, влакна, капсуле, микро/наночестице и мембране), што их чини атрактивним избором као материјала носиоца у системима испоруке лекова, што показује велики број студија објављених током последњих 20 година [380].

Они су примењени на широк спектар лекова, од слабо растворљивих, као што су индометацин, папаверин-хидрохлорид, грисеофулвин и преднисолон, до макромолекулских хидрофилних лекова као што су протеини и гени и показују низ атрактивних својстава као носиоци. Објављен је велики број радова о потенцијалу микробних полисахарида као носилаца у систему испоруке лека [357]. Ти радови се углавном односе на примену хитозана као носиоца лека, посебно за пренос биотехнолошких лекова као што су пептидни и протеински лекови, вакцине и гени.

Конкретно, хитозан и његови деривати су интересантни због свог јединственог катјонског полимерног карактера, биоадхезивности, биоразградљивости, биокомпатибилности, нетоксичности, способности да формирају заштитне фолије и премазе, а посебно њихове способности да омогућују апсорпцију малих поларних и протеинских лекова путем слузокоже. Поред хитозана, фокус је касније такође усмерен на примену алгината, хитина, пулулана, гелан гуме, декстрана, хијалуронске киселине и њихових деривата као платформе за испоруку лекова и администрацију активног агенса различитим путевима, као што су орални, назални, парентерални, окуларни и други [381].

Да би се побољшала испорука различитих врста лекова, коришћени су микробни полимери у облику једноставног раствора или праха, као и у нешто финијим формулацијама честица као што су матрице и капсуле за постепено ослобађање, микрочестице, наночестице, филмови, обложене капсуле и липозоми, мембране, и многи други се тренутно примењују или су у фази развоја. Овакви системи треба да омогуће контролу стопе администрације лека и продуже трајање терапијског ефекта, као и навођење лека на тачно одређене локације. Скоро сваки могући начин администрације лека има користи од употребе неког облика полисахарида у погледу побољшања терапијског ефекта или смањења нежељеног токсичног ефекта. Различите врсте система испоруке лекова засноване на хитозану се препоручују за вагиналну апликацију и приказане су у табели 4.7.

Табела 4.7. Системи за контролисано и циљно отпуштање биоактивних супстанци за вагиналну примену лекова засновани на хитозану

Лек	Систем испоруке	Референца
5 флуороурацил (5ФУ)	Таблете (хитозан и поликарбофил интерполи електролит комплекс (ИПЕЦ))	382
хлорхексидин диглуконат	Вагинални инсерт (хитозан/алгинат комплекс)	383
анти-ХИВ мицробициде (Тенофовир®)	Нанопартикуле обложене хитозаном (НПс)	384
метронидазол	Таблете (ФГ90 хитозан)	385
еконазол нитрат	Хитозанске мукоадхезивне микрочестице	386
млечна киселина	Хитозан интравагиналне таблете.	387
метронидазол	Хитозански мукоадхезивни филм	388
инсулин	Хитозанске микрочестице	389
Ветеринарски антимикробни лек, Ацрифлавин®	Хитозанске вагиналне таблете	390
клотримазол	хитосан-TGA <i>conjugates</i> вагиналне таблете	391
клиндамицин	Хитозан- PVP гел	392

4.4.4. Системи испоруке лека на бази микро / нано хитозанских честица

Инкапсулација је поступак којим се биолошки активне компоненте (активне супстанце, биоактивни агенси, лекови, лековите супстанце), у овом сличају етарска уља, физичким или хемијским путем смештају унутар структуре одређеног носача. Циљ инкапсулације, поред повећања стабилности током транспорта, складиштења и процесуирања јесте и омогућавање лакшег поступања са активним компонентама,

тако што се изврши њихова конверзија из течног у чврсто стање. Остали жељени ефекти инкапсулације укључују контролисано отпуштање, одвајање некомпатибилних једињења, маскирање непријатног укуса активних супстанци, као и побољшање квалитета крајњих продуката [376, 377, 378, 379]. Поред тога инкапсулација представља заштиту фотосензитивних и испарљивих етарских уља, који ће инкорпорирани у одговарајуће микропартикуле одржати свој квалитет и фармаколошке особине. Због тога је последњих година инкапсулација етарских уља постала веома занимљива и широко испитивана, посебно када је у питању њихова антимикуробна употреба за конзервацију хране али и у медицинске сврхе [393, 394, 395, 396].

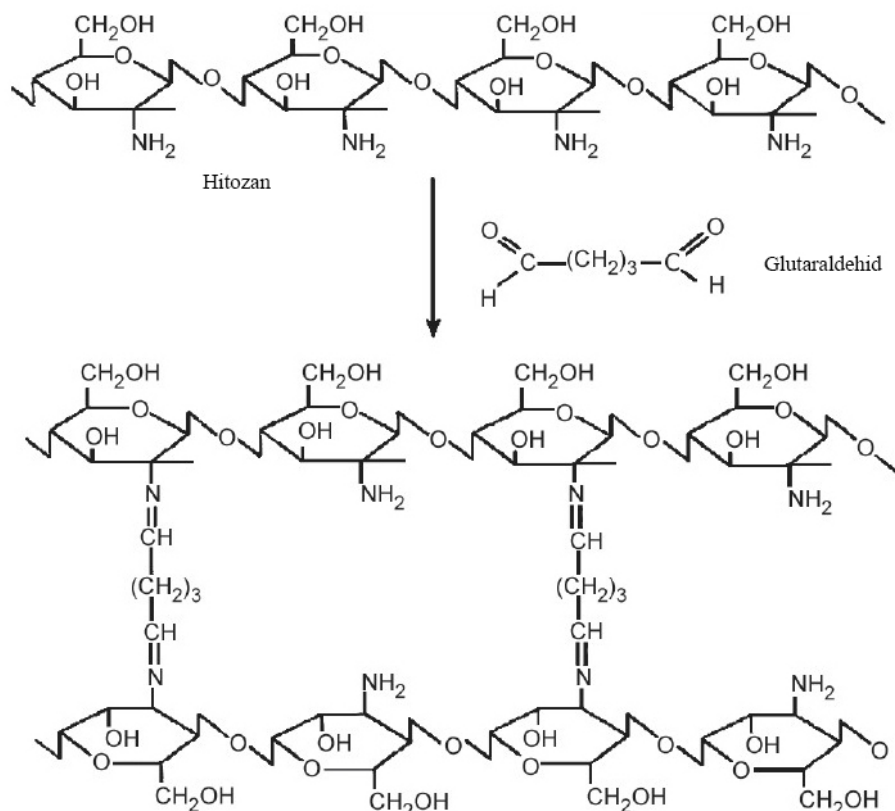
Инкапсулација се постиже мешањем раствора биолошки активне компоненте са раствором полимера. Тако добијена смеша се диспергује екструзијом или се емулзификује у циљу добијања капљица које се затим подвргавају процесу очвршћавања

Бројне студије указују да ће смањење пречника честица до микро или нано величине додатно повећати ефикасност неког система испоруке лека на бази микробних полисахарида, посебно за оралну или интраназалну испоруку многих слабо растворљивих лекова или макромолекулских хидрофилних лекова као што су пептиди, протеини, вакцине или ДНК [397]. Примери у литератури су бројни у погледу њихове употребе, као средство за пероралну, назалну и очну испоруку у циљу да се продужи време контакта и побољша апсорпција лекова, а такође се користе за испоруку гена [397].

У недавно објављеним прегледима, истичу се ранија и садашња истраживања, објављена у протеклој деценији, о различитим апликацијама хитозана као система за испоруку лека на бази микро/наночестица [381]. Многе методе могу да се користе за добијање система за испоруку лека на бази микро/наночестица, укључујући умрежавање (*cross-linking*), технике испаравања емулзија/растварача, јонско гелирање, коацервација/преципитација (таложње), сушење распрскавањем, коалесценција, просејавање, мембранска микрофилтрација и друге [398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405]. Након припреме, различите микро/наночестице су разврстане по величини и расподели величина, порозности, *in vivo* и *in vitro* стабилности, нивоу запремине лека и стопе отпуштања. Сваки метод припреме има своје предности и мане. Одабир представља функцију одређеног лека и типа помоћне супстанце, начина администрације, захтеваног пречника честица, примене и циља уградње лека у полимерну матрицу и мора да се обави испитивање за сваку комбинацију помоћне супстанце и лека која је од интереса. На пример, веће микрочестице и честице хитозана (до неколико хиљада микрона) се обично користе за продужено отпуштање лека и протеина, док су мале микрочестице хитозана (<5 μ m) добијене полиелектролитском формацијом комплексне мембране, са антиканцерогеним дејством, као што је 5-флуороурацил (5-ФУ) описане као средство за циљну испоруку лека.

Хитозанске микрочестице које се користе за инкапсулацију биоактивних супстанци могу се добити применом методе неутрализације (укапавањем раствора хитозана у раствор алкалија, најчешће натријум-хидроксида, при чему услед повећања рН вредности долази до очвршћавања микрочестица хитозана) или јонотропском гелирајућом методом (укапавањем раствора хитозана у раствор ањонског полиелектролита). Један од најчешће коришћених очвршћавајућих агенаса за јонско гелирање хитозана је натријум-триполифосфат (Na-TPP). Натријум-триполифосфат је нетоксични полианјон који реагује са хитозаном привлачењем

супротно наелектрисаних молекула, тј. електростатичким силама и формира у води нерастворан комплекс. Поред њега за добијање малих хитозанских честица сферног облика користи се и емулгациона техника стварања унакрсних веза употребом глутаралдехида као умрежавајућег агенса, који је такође нетоксичан, где се хитозан ковалентно умрежава са глутаралдехидом преко амино група. Алдехидне групе глутаралдехида стварају ковалентно везане имине са амино групама хитозана (слика 4.9.).

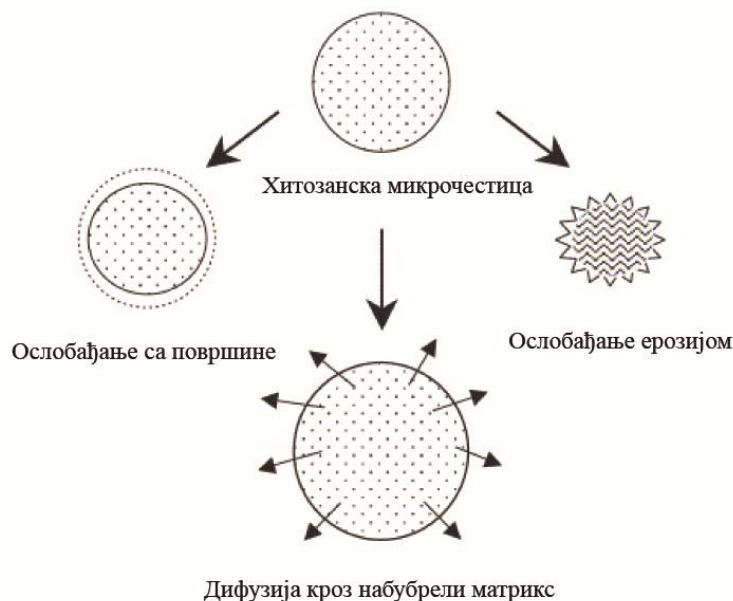


Слика 4.9. Шемајски приказ ђелирања хитозанских микрочестица са глутаралдехидом.

Сprovedено је неколико истраживања која су се бавила једноставним методама умрежавања емулзија за припрему микрочестица на бази хитозана у које је унет лек. У том процесу, микрочестице су припремљене од система емулзије воде / уља коришћењем различитих врста уља у екстерној фази и раствора хитозана у сирћетној киселини, у дисперзионој фази. Гелирање капљица је тада постигнуто умрежавањем амино група хитозана помоћу одговарајућег алдехидног агенса умрежавања. Чини се да су молекуларна тежина хитозана, концентрација и густина наелектрисања, протокола емулзије (врста спољног медија и емулгатора, адитива, брзина мешања), врста и концентрација агенса умрежавања као и концентрација лека важни фактори који су оптимизовани у циљу побољшања својстава микрочестица. Изгледа да се, када се користи глутаралдехид (GA) за умрежавање микрочестица хитозана, смањује њихова биоразградљивост и зато могу да се користе као средство испоруке са продуженим дејством. На пример, Jameela и др. наводе да микросфере

хитозана пречника 45-300 μm , полимеризоване глутаралдехидом и напуњене прогестероном, могу да представљају занимљив систем за дугорочну испоруку стероида, јер су у стању да одрже више или мање униформну концентрацију серума стероида код кунића у периоду од око пет месеци [406]. Кумбар и др. спровели су студију отпуштања користећи различите агенсе за умрежавање за припрему микрочестица хитозана пуњених диклофенаком, указујући да су микросфере полимеризоване глутаралдехидом имале најспорији профил отпуштања, посебно у односу на микрочестице полимеризоване топлотом [407]. Међутим, постоје докази о токсичности глутаралдехида који се користи за умрежавање, што ограничава његово коришћење у фармацеутској индустрији. Наводи се да се додавањем емулзије стабилизатора екстерном медију као што је диоктил сулфосукцинат унапређује стабилност и омогућава да највећи део лека остане унутар микросфера полимеризованих глутаралдехидом. Тако је, у овој студији постигнута ефикасност енкапсулације до 80% за теофилин, аспирин или грисеофулвин који су коришћени као главни лекови у истраживању [406].

Ослобађање активне супстанце из хитозанских честица зависи пре свега од густине мреже, морфологије, величине саме честице као и физичкохемијских особина активне супстанце која је инкорпорирана у честицу. *In vitro* ослобађање такође зависи од рН вредности, поларности и присуства ензима у одговарајућем медијуму који се прати. Постоје три различита механизма којима се активна супстанца ослобађа из хитозанске честице: а) ослобађање с површине честице, б) дифузија кроз набубрели матрикс и ц) ослобађање ерозијом.



Слика 4.10. Механизми ослобађања активне супстанце из хитозанске микрочестице.

На основу изложеног хитозан има све жељене особине за безбедну употребу као носач фармаколошки активних супстанци. За оптималну употребу хитозана као полимера за израду *drug delivery systema* веома је важно хемијски модификовати хитозан да би се добиле физичко хемијске особине као што су растворљивост, хидрофилност, биодеградибилност, мукоадхезивност. Инкапсулација је једна од

најпожељнијих метода израде *drug delivery systema* посебно када су у питању лако испарљиве супстанце као што су етарска уља.

Услед доказаног снажног антибактеријског дејства испарљивих етарских уља која ће се инкапсулирати у ове хитозанске микрочестице, као и антибактеријског дејства самог хитозана, ови системи би могли да буду од великог значаја у регулисању нормалне вагиналне микрофлоре жене у репродуктивном периоду.

5. МАТЕРИЈАЛИ

5.1. Материјал за микробиолошку и хемијску анализу

5.1.1. Испитивана етарска уља

За хемијску и микробиолошку анализу коришћена су етарска уља која су дата у табели 5.1., заједно са прегледом биљке из које су изолована, фамилије и произвођача. Одабир етарских уља је вршен на основу индивидуалне процене и литературних података о претходно потврђеној антибактеријској активности употребљених етарских уља.

Табела 5.1.

Име ет.уља	Биљка	Фамилија	Произвођач
Тимијан	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Sanoflore Francuska
Оригано	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Sanoflore Francuska
Жалфија	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	Sanoflore Francuska
Еукалиптус	<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	La Florina Немачка
Ким	<i>Carum carvi</i>	Apiaceae	La Florina Немачка
Коријандер	<i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae	La Florina Немачка
Коморач	<i>Foeniculum vulgare</i>	Apiaceae	La Florina Немачка

5.1.2. Коришћене културе микроорганизама

За испитивање *in vitro* антимикуробне активности етарских уља, коришћене су каталожке културе индикаторских патогених сојева микроорганизама (ATCC - American Type Culture Collection) које се најчешће користе за испитивање ефикасности антимикуробних супстанци, а потенцијални су колонизатори урогениталног тракта. Индикаторски патогени сојеви су обухватили следеће културе бактерија и квасца:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Candida albicans* ATCC 24433
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Из групе бактерија млечне киселине, одабрани су сојеви врста које могу насељавати урогенитални тракт, па је са тог аспекта, утицај испитиваних етарских уља на ове бактерије од интереса за даљи рад. Културе бактерија млечне киселине су обухватале следеће врсте:

- *Lactobacillus acidophilus*,
- *Lactobacillus rhamnosus* LGG,

- *Lactobacillus fermentum*
- *Lactobacillus casei*

5.1.3. Коришћене подлоге

За гајење и одржавање микроорганизама из групе индикаторских сојева коришћене су подлоге Триптон соја бујон и агар (Торлак, Србија).

За гајење и одржавање микроорганизама из групе млечних бактерија коришћене су подлоге МРС бујон и агар (Торлак, Србија).

За утврђивање антимикуробног дејства етарских уља, имобилисаног етарског уља као и за антибиограм, коришћена је подлога Милер Хинтон (BBL Vecton Dickinson) у форми бујона, агара и софт агара (0.06% агар-агара, Торлак, Србија).

5.2. Материјали за прављење хитозанских микрочестица

5.2.1. Материјал потребан а прављење водене фазе:

- млечна киселина,
- хитозан,
- глутеаралдехид и
- дестилована вода.

Водена фаза се меша са уљаном фазом у жељеном односу, који је потребан за израду микрочестица.

5.2.2. Материјал потребан за прављење уљане фазе:

- етарско уље тимијана,
- парафинско уље и
- Tween 80.

Да бисмо добили уљану фазу, етарско уље се меша са парафином да би се добила жељена концентрација етарског уља у парафину, и додаје се Tween 80.

5.2.3. Опрема која се користи:

- магнетна мешалица,
- уређај за мешање (Yellow line di 25 basic),
- центрифуга (сигма 2-16), в
- водена пумпа са Бихнеровим левком и
- аутоматска пипета.
- Колориметас МА 9504. Метрих
- Hewlett Packard 5973-689 GC-MS систем

6. МЕТОДЕ

У овом раду све методе можемо поделити на:

1. Хемијска анализа етарских уља
2. Микробиолошка испитивања етарских уља
3. Методе израде хитозанских честица са етарским уљем тимијана

6.1. Хемијска анализа

6.1.1. Припрема етарских уља за GC/MS анализу

Узорци етарских уља за GC/MS анализу растворени су у дихлорометану, при чему је добијен ~10 %-ни раствор.

Гасна хроматографија са масеном спектрометријом (GC-MS)

Гасно-хроматографска анализа етарских уља је вршена у Hewlett Packard 5973-689 GC-MS систему у ЕИ моду на 70eV са спектрометријском детекцијом маса (GC-MS-Gas Chromatography-Mass Spectroscopy) . Почетна температура капиларне колоне HP 5MS (30m x 0,25mm; дебљина филма 0,25µm) била је постављена на 60°C, а потом је брзином од 3°C/min загрејана на 280°C. Хелијум је био гас носач, са протоком од 1ml/min. У GC колону ињектовано је по 1µl испитиваних узорака при сплит-у 1:10.

Идентификација компонената етарског уља

Идентификација компоненти базирана је на израчунатим ретенционим индексима (РИ) [408] и масеним спектрима упоређиваним са стандардним супстанцама и/или са НИС/НБС Wiley библиотеком масених спектра, као и са литературним подацима или са подацима слободне базе података (<http://www.flavornet.org/iowtv.pherobase.com>) [409]. Експерименталне вредности ретенционих индекса су одређене коришћењем "calibrated Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System software" (AMDIS ver.2.1., DTRA/NIST, 2002). Резултати су поређени са ретенционим индексима из литературних података [40] и са, на интернету доступном, базом података

6.2. Микробиолошка испитивања

Ова испитивања су имала за циљ да се, на основу приказане антимикуробне активности појединачних етарских уља, *in vitro*, изврши селекција најпогоднијег уља за даљи развој препарата на бази хитозанских честица. Из тог разлога, ова испитивања су подељена у две групе. Прву групу су чинила испитивања антимикуробног дејства наведених врста етарских уља, стандардним микробиолошким методама – методом дифузије на агарној подлози и бујон дилуционом методом одређивања минималне инхибиторне концентрације (МИС). Друга група испитивања је базирана на одређивању антимикуробне активности селекционисаног етарског уља након инкапсулације у хитозанске честице, која има за циљ заштиту испарљивог фотосензитивног етарског уља и продужење његовог дејства у условима контролисаног отпуштања.

6.2.1. Испитивања антимикуробног дејства етарских уља

Припрема суспензија микроорганизама и стандардизација инокулума

Суспензије микроорганизама добијене су додавањем ћелија једнодневних бактеријских култура израслих на косом хранљивом агару у стерилан физиолошки раствор. За добијање инокулума одређеног замућења коришћен је МцФарланд-ов стандард 0.5, што одговара замућењу које настаје у реакцији између 99.5 ml 0.1-моларног раствора сумпорне киселине (H_2SO_4) и 5ml раствора 0.2 моларног баријум-хлорида дихидрата ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$). Замућење је подешавано фотоелектричним фотометром при чему је коришћен црвени филтер (КОЛОРИМЕТЕР МА 9504. Метрих). Метода се заснива на мерењу интензитета пропуштене светлости, односно апсорбанце (А) или трансмисије (Т), уз претходно експериментално дефинисану функционалну везу ових величина са концентрацијом [410]. На овај начин добијена суспензија омогућава семиконфлуентан раст микроорганизама (раст ћелија у форми тешиха на Петри плочи) и број ћелија у колонији који апроксимативно износи 1.5×10^8 према процедури CLSI, 2005 [411].

Одређивање антимикуробног дејства слободних етарских уља методом дифузије у бунарчићима на агарној подлози

Метода дифузије у бунарчићима је коришћена за одређивање антимикуробне активности различитих етарских уља, као и етарских уља која су инкапсулирана у хитозанске честице.

На Петријеве плоче са припремљеном стерилном Миллер-Хинтон ТСА (Триптон соја агаром-Торлак) подлогом постављене су цевчице, пречника 6 mm, које се затим преливају софт агаром (0.60 % агара) исте подлоге, који је инокулисан индикаторским патогеним сојем (0.2 ml 24-сатне бујонске културе на 6 ml софт

агара). Након очвршћавања агара, цевчице се ваде, а у формиране бунарчиће се наноси по 20 μ l испитиваног етарског уља. Плоче се инкубирају на 37 °C у трајању од 24 сата. Упоредо са испитивањем антимикубног дејства етарских уља, вршено је и испитивање антимикубног ефекта млечне киселине (20 μ l) као и антимикубног дејства смеше појединачног етарског уља и млечне киселине у циљу одређивања њиховог потенцијалног синергистичког ефекта (смеша је садржала 50 ppm млечне киселине на 20 μ l етарског уља .)

Позитивна реакција се огледа у бистрој зони (без раста индикаторских култура) око бунарчића. Ради утврђивања бактерицидног, односно, бактериостатичког деловања, бактериолошком езом је узиман узорак из зоне око бунарчића и засејаван у Милер Хинтон бујону. Уколико се након инкубације на 37 °C, 24 h, не јавља раст у бујону, антимикубна супстанца показује бактерицидно дејство. У супротном, антимикубна супстанца је бактериостатична, односно, само зауставља раст али не убија индикаторски патогени сој. Као позитивна контрола антибактеријског дејства етарских уља, на испитиване микроорганизме, узети су резултати зона инхибиције одговарајућег антибиотик–клиндамицина (10 μ g/ml) и антимикутика нистатина (30 μ g/ml).

Антимикубно дејство етарских уља се изражава ширином зоне инхибиције, која се мери и изражава у mm.

Одређивање антимикубног дејства етарског уља инкапсулисаног у хитозанским честицама методом дифузије на агарној подлози

Ова испитивања су заснована на методи агарне дифузије, описане у претходном поглављу. Међутим, због специфичности испитиваног материјала (етарско уље инкапсулисано у хитозанске честице), припрема материјала за анализу је захтевала додатне кораке. У претходном кораку, хитозанске честице (0,23 g) са инкапсулисаним уљем у различитим концентрацијама (0,3%, 0,6%,1,2%,1,5%), које су припремљене по методи која је касније описана (поглавље 3), су растваране у 400 μ l ацетатног пуфера (pH 4.6). На тај начин су добијене суспензије које су наносене у претходно припремљене бунарчиће (као по методи описаној у поглављу 2.1.3) на агарним подлогама, у запремини од 20 μ l.

Након одговарајућих услова инкубације (24 h, на 37°C), одређивана је ширина зоне инхибиције етарског уља тимијана ослободјеног из хитозанских честица.

Одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC)

Минимална концентрација активне супстанце која спречава раст у стандардној суспензији микроорганизама представља минималну инхибиторну концентрацију (MIC) и одраз је релативне осетљивости микроорганизама. Како је минимална инхибиторна концентрација у највећем броју случајева недовољна да би лечење било ефикасно, неопходно је одредити минималну бактерицидну концентрацију (MBC), односно концентрацију антимикубног агенса која је смртоносна за дати микроорганизам.

При одређивању минималне инхибиторне концентрације, као хранљива подлога коришћен је Милер Хинтон. У епрувету са 2,997ml подлоге, додато је по 3 μ l етарског уља, а затим су, у серији епрувета са истом хранљивом подлогом, припремљена одговарајућа разблажења испитиваних етарских уља. Због разлике у приказаној антимикуробној активности применом методе дифузије на агару, за етарска уља тимијана и оригана су испитиване концентрације од 1, 3, 5 и 10 μ l/ml, а за етарска уља жалфије и еукалиптуса, концентрације од 10, 30, 50 и 100 μ l/ml.

У припремљене епрувете са разблаженим етарским уљима, и у контролну епрувету (без етарских уља), инокулисани су индикаторски сојеви микроорганизама (1% инокулум) и епрувете су инкубирани на 37 °C.

У одређеним временским интервалима, након 1, 3, 8, 16 и 24h, праћена је промена оптичке густине (на колориметру уз коришћене жутог филтера, 575 nm). Повећање оптичке густине (OD) или замућење, означава повећање биомасе микроорганизама у течној подлози. У присуству инхибиторних супстанци, OD се неће мењати или ће се спорије повећавати, у односу на контролну подлогу без инхибиторне супстанце. MIC се дефинише као прва концентрација етарског уља у чијем присуству нема замућења, односно видљивог раста бактерија. MBC представља концентрацију која убија 99.99% микроорганизама, што је 99.99% смањења од почетне (финалне) бројности бактерија у бујону.

6.3. Методе израде хитозанских честица са етарским уљем тимијана

6.3.1. Добијање микрочестица

Хитозанске микрочестице са инкапсулираним етарским уљем тимијана добијене су емулгационим поступком.

Рађене су две серије честица:

1. У првој серији варирана је концентрација етарског уља.
2. У другој серији варирана је концентрација умреживача-глутаралдехида.

У свакој серији честица прављено је по четири врсте честица, свака са различитом концентрацијом вариране супстанце. Узето је да однос водене и уљане фазе буде 1 : 5, односно 10 ml водене емулгујемо са 50 ml уљане фазе за сваку врсту честица.

I Хитозанске микрочестице у којима је варирана концентрација етарског уља тимијана

Уљана фаза: Праве се четири врсте честица са различитим концентрацијама етарског уља тимијана:

1. Честице које садрже 0,3 % тимијана у парафину, односно честице концентрације 3 μ l/ml етарског уља у парафинском уљу.
2. Честице које садрже 0,6 % тимијана у парафину, концентрације 6 μ l/ml.

3. Честице које садрже 1,2 % тимијана у парафину, концентрације 12 $\mu\text{l/ml}$.
4. Честице које садрже 1,5% тимијана у парафину, концентрације 15 $\mu\text{l/ml}$

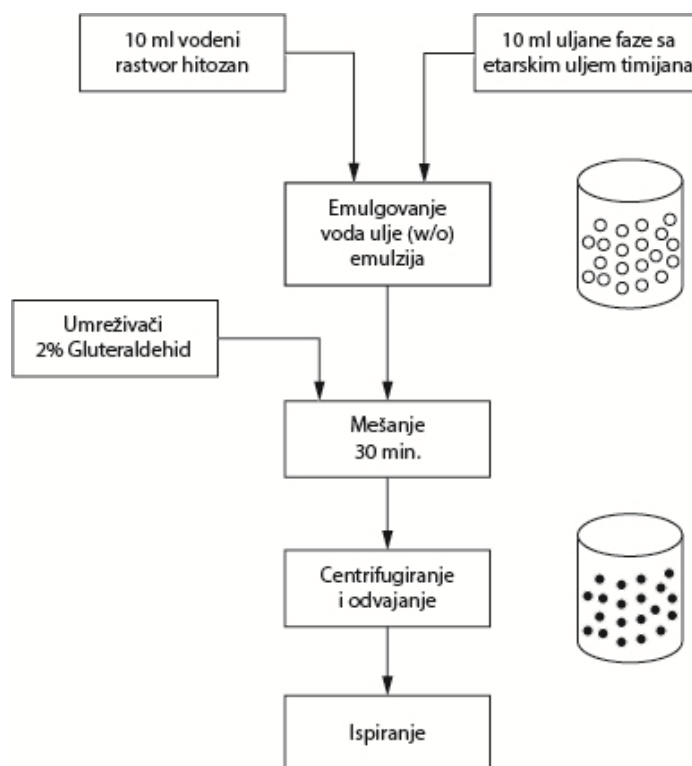
Израђеним растворима различитих концентрација тимијана у парафину, додаје се 0,5 ml Tween 80 тако да његов садржај у уљаној фази буде 1 %.

Поступак прављења уљане фазе: Израђује се по 50 ml уљане фазе за сваку серију честица одређене концентрације тимијана.

1. Одмери се аутоматском пипетом 150 μl тимијана и допуни парафином до 50 ml, и добија се раствор тимијана у парафину концентрације 3 $\mu\text{l/ml}$ и дода 0,5 ml Tweena 80 (да би се добио 1 % раствор Tween 80).
2. Одмери се 300 μl тимијана и допуни парафином до 50 ml, и добија се раствор тимијана у парафину концентрације 6 $\mu\text{l/ml}$ и помеша се са 0,5 ml Tween 80.
3. 600 μl тимијана се допуни парафином до 50 ml, и добија се раствор тимијана у парафину концентрације 12 $\mu\text{l/ml}$ и дода 0,5 ml Tween 80.
4. 750 μl тимијана се допуни парафином до 50 ml, и добија се раствор тимијана у парафину концентрације 15 $\mu\text{l/ml}$ и дода 0,5 ml Tween 80.

Водена фаза: За сваку врсту честица се направи по 10 ml водене фазе.

Поступак припреме водене фазе: Водена фаза се припрема тако што се у стакленој чаши помеша 0,1 г хитозана (да би се добио 1 % раствор) са 1,65 г млечне киселине (да би се добио 1,65 % раствор) и допуне водом до 10 ml. Затим се састојци мешају на магнетној мешалици (слика 3.1), 10 мин на 8 000 o/min, да би се добила хомогена смеша.



Слика 6.1. Шемајски приказ припремања хитозанских честица cross-linking методом

Након што се направе уљана и водена фаза, емулгују се 10 ml водене фазе и 50 ml уљане фазе за сваку врсту честица, тако да се добије потребан однос водене и уљане фазе 1:5. У израђену емулзију се додаје 4,15 ml умреживача глутаралдехида (у количини од 2 % у односу на укупну запремину уљане и водене фазе) у капима и све заједно меша 30 мин на 10000 о/мин у уређају за мешање (слика 6.1., Yellow line di 25 basic). Смеша се центрифугира 10 мин на 4000 о/мин (слика 6.1. центрифуга, сигма 2-16). Након центрифугирања одвоји се супернатант, из кога се одређује колчина тимијана која се није уградила у микрочестице. Запремина супернатанта се измери, и касније се ова вредност користити у прорачуну. У талогу након центрифугирања се налазе честице, које се даље испирају, према касније описаном поступку испирања.

II Хитозанске микрочестице са инкапсулираним тимијаном, приликом варирања концентрације глутаралдехида

Израђене су три врсте хитозанских честица са почетном концентрацијом тимијана од 1,5 % и у којима је варирана концентрација умреживача, глутаралдехида, од 3; 5 - 8 %, као и једна врста честица са почетном концентрацијом тимијана од 1,2 % и глутаралдехида од 2 %. Честице су направљене на већ описан начин, при чему је овог пута варирана концентрација глутаралдехида.

6.3.2. Испирање честица и чување

Израђене хитозанске честице се из кивета центрифуге, пресипају након одвајања супернатанта, етанолом у чашу, а затим се врши њихово испирање на вакум пумпи. За испирање се користи филтер папир, који се ставља у Бихнеров левак, и испирање се врши 1% раствором Tween-a, етанолом и дестилованом водом. Прво се честице испирају са 175 ml 1 % раствора Tween-a (да се одмасте честице од уља), а затим са смешом која се састоји од 80 ml етанола и 75 ml дестиловане воде. Запремина издвојеног испирка се измери, а затим се измери маса овако испраних честица на аналитичкој ваги. Део честица се користи за микроскопско мерење и сликање, а део за проучавање кинетике отпуштања биоактивне супстанце, старског уља тимијана. Микрочестице за сликање се чувају у ацетатном пуферу рН 4,6 у нормалном суду (честице се шпатулом пажљиво пренесу у нормалан суд који се допуни до ознаке ацетатним пуфером).

6.3.3. Праћење отпуштања биоактивне супстанце *in vitro* (узорковање)

Узете су 4 чаше по 100 ml. Након што се исперу, на аналитичкој ваги се измери по 100 мг сваке врсте честица из серије чија кинетика се одређује. Честице се узимају са шпатулицом и пажљиво стављају на сахатно стакло, свака врста посебно, измери се жељена маса и пребацује у посебну лабораторијску чашу. Часе са одмереним честицама се допуне ацетатним пуфером, рН=4,6 до 50 ml, обележе и ставе у термостат, на 37 °С. На сваких сат времена се врши узимање узорака, укључујући и нулти сат, односно време када су честице стављене у ацетатни пуфер,

као почетни сат за испитивање кинетике. Узорковање се врши према описаном поступку (одељак 6.3.4.3.).

*Приликом прављења друге серије честица, на аналитичкој ваги је одмерно по 0,5 g микрочестица сваке врсте, и затим допуњено ацетатним пуфером до 50 ml.

6.3.4. Кинетика отпуштања полифенола

Кинетика отпуштања полифенола из микрочестице у околни медијум је праћена преко промене концентрације укупних полифенола, у току времена.

6.3.4.1. Одређивање укупних полифенола – FC методом

Најпоузданија метода за одређивање укупних полифенола јесте Folin-Ciocalteu (FC) метода. Реакцијом полифенола и FC реагенса (смеша фосфоволфрамова и фосфомолибденске киселине) у благо алкалним условима долази до стварања релативно стабилног плаво обојеног комплекса, који потом можемо спектрофотометријски одредити при 765 nm.



Слика 6.2. Реакција полифенола с Folin-Ciocalteu реагентом –методом за одређивање укупних полифенола

При оксидацији фенолних једињења фосфоволфрамова и фосфомолибденска киселина се редукују у волфрамов оксид и молибденов оксид, који су плаво обојени (Слика 6.2.)

6.3.4.2. Израда баждарне криве за FC методом

За израду баждарене криве као стандард се користило етарско уље тимидјана познате концентрације. Припремљен је основни раствор, тако што се одмери 100 μ l етарског уља тимидјана и помеша са 50 ml раствора вода-метанол (раствор вода-метанол у односу 1:1), и тако смо добили основни раствор концентрације 2 μ l/ml

(100 μl тимижана/50 ml вода-метанол). У основни раствор се додаје 500 μl Tween-a (да се добије 1% раствор Tweena), а затим се хомогенизује на магнетној мешалици.

За израду баждарне криве прави се серија од 6 разблажења. Узимамо шест малих епрувета, и још две епрувете за слепу пробу. У епрувете додајемо редом 200, 400, 500, 600, 800 и 1000 μl основног раствора. Затим у сваку епрувету додајемо истим редоследом раствор вода-метанол, до 1000 μl (800, 600, 500, 400, 200 μl). Слепе пробе се састоје само из раствора вода-метанол, 1000 μl . Добијамо различита разблажења у епруветама, редом:

1. 200 μl основног раствора и 800 μl раствора вода-метанол, концентрације 0,4 $\mu\text{l}/\text{ml}$
2. 400 μl основног раствора и 600 μl раствора вода-метанол, концентрације 0,8 $\mu\text{l}/\text{ml}$
3. 500 μl основног раствора и 500 μl раствора вода-метанол, концентрације 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$
4. 600 μl основног раствора и 400 μl раствора вода-метанол, концентрације 1,2 $\mu\text{l}/\text{ml}$
5. 800 μl основног раствора и 200 μl раствора вода-метанол, концентрације 1,6 $\mu\text{l}/\text{ml}$
6. 1000 μl основног раствора, концентрације 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$
7. и 8. Слепа проба, само раствор вода-метанол

Пребацујемо по 100 μl сваког узорка у нове епрувете. У узорке се додаје по 750 μl натријум-хидрогенкарбоната, и по 750 μl разблаженог FC реагенса.

FC реагенс се припрема тако што се 1 ml FC реагенса разблажи са 9 ml дестиловане воде.

Узорци су остављени да одстоје 30 мин на собној температури, након чега је мерена апсорбанца на УВ спектрофотометру (UV/VIS Scanning Models / UV - 3100 (PC), China) на 765 nm. Мере се две вредности апсорбанци за сваки узорак и рачуна се средња вредност.

Баждарна крива је нацртана на основу измерених средњих вредности апсорбанци и одговарајућих концентрација тимижана. На апсцису се нанесу вредности концентрације тимижана ($\mu\text{l}/\text{ml}$), а на ординату средње вредности измерених апсорбанци на таласној дужини од 765 nm.

6.3.4.3. Припрема узорака за FC методу

Узимају се узорци за сваку врсту честица одговарајуће серије, чија се кинетика испитује. Узорци се узимају од тренутка када се честице исперу и ставе у ацетатни пуфер, и ово време се сматра за почетно време. Узорци се узимају у одређеним временским интервалима, у нултом часу, након једног сата, два сата итд.

Узорковање се врши тако што се чаше са честицама које се налазе у пуферу изваде из термостата, узорци се узимају аутоматском пипетом, по 500 μl из сваке чаше, односно од сваке врсте честица. Сваки узорак се пребацује у посебну малу епрувету, које се претходно обележе, а чаше са честицама се поново враћају у термостат. Епрувете са 500 μl узорка се чувају у фризицеру, и из њих се даље узимају узорци за кинетику. То значи да се за сваки испитивани сат мере по четири врсте узорка, за сваку врсту честица по један.

6.3.4.4. Поспийак мерења након узимања узорак из чашица

Претходно узети узорци се изваде из фрижидера и аутоматском пипетом се одмери у чисте епрувете по 100 μl сваког узорка, а затим дода 750 μl натријум-хидрогенкарбоната, и 750 μl разблаженог FC реагенса. Преостали део узорак се враћа у фрижидер, и чува у случају поновног мерења.

Узорци се оставе да одстоје 30 мин на собној температури, након чега се мере апсорбанце развијеног плавог обојења на 765 nm. Сваки узорак припремљен је у две паралелне пробе, а резултат је изражен као средња вредност добијених резултата.

На исти начин је припремљена и слепа проба, али је уместо узорка коришћена дестилована вода или натријум-хидрогенкарбонат.

6.3.5. Одређивање степена инкапсулације тимијана

Ефикасност инкапсулације тимијана се рачуна као количина тимијана (полифенола) инкапсулираног у микрочестице подељено са количином укупног тимијана (укупних полифенола) потрошених за припрему микрочестица, као што је приказано у једначини (1):

$$EE\% = \frac{m_e}{m} \quad (1)$$

6.3.6. Поступак одређивања степена инкапсулације и запремине заосталог тимијана у честицама

Припрема узорак је извршена као што је описано у одељку за 6.3.4.3.FC методу, а затим је мерена њихова апсорбанца.

1. Поступак прорачуна за честице код којих је варирана концентрација тимијана

На основу добијених резултата апсорбанце супернатанта и на основу једначине баждарне криве, прорачунава се концентрација отпуштеног тимијана у супернатанту (у $\mu\text{l/ml}$) на следећи начин:

$$C \text{ (отпуштеног тимијана у супернатанту)} = A/0,7866$$

Овако добијене концентрације тимијана у супернатанту (C_s , $\mu\text{L/ml}$) треба помножити са запремином супернатанта, да би се добила запремина отпуштеног тимијана пре испирања микрочестица:

$$Q_s = C_s * V_s$$

Q_s - количина отпуштеног тимијана у супернатанту; C_s -концентрација отпуштеног тимијана у супернатанту; V_s –запремина супернатанта

Затим се израчунава степен инкапсулације тимијана ($EE\%$) у хитозанским микрочестицама. Од почетне концентрације тимијана одузима се количина отпуштеног тимијана (количина у супернатанту), и дели са почетном концентрацијом тимијана:

$$EE\% = [Q_i - Q_s / Q_i] * 100$$

Q_i -иницијална количина етарског уља тимијана; Q_s – количина отпуштеног тимијана у супернатанту .

Степен инкапсулације у процентима EE (%) добијамо када ову вредност помножимо са 100.

Концентрацију тимијана у испирку (C_{ro}), добијамо на основу средње вредности апсорбанце испирка (A_{av}) и нагиба стандардне праве.

$$C_{ro} (\text{отпуштеног тимијана током испирања}) = A_{av} / \text{Nagib}$$

Количина отпуштеног тимијана приликом испирања честица се израчунава као производ отпуштеног тимијана у току испирања и запремине испирка:

$$Q_{ro} = C_{ro} * V_{ro}$$

Q_{ro} - количина отпуштеног тимијана приликом испирања честица; C_{ro} -концентрација отпуштеног тимијана приликом испирања честица ; V_{ro} –запремина испирка

Количина преосталог тимијана у честицама (инкапсулираног тимијана) се израчунава:

$$Q_e = Q_i - [Q_s + Q_{ro}]$$

Q_e -количина инкапсулираног уља тимијана ; Q_i - почетна количина тимијана ; Q_s - количина исцурелог тимијана у супернатанту; Q_{ro} – количина исцурелог тимијана приликом испирања честица

2. Поступак прорачуна степена инкапсулације за честице код којих је варирана количина глутаралдехида, и израчунање процента отпуштања тимијана у току времена

Поступак прорачуна степена инкапсулације за честице код којих је варирана количина глутаралдехида [2%, 3%, 5%, 8%] се прорачунава као и у претходном случају.

Израчунавање процента отпуштеног тимијана:

Процент отпушеног тимијана (%) = $\frac{C \text{ (отпушеног тимијана у испирку)} * V \text{ (пуфера)}}{m \text{ (честица)}} / V \text{ (осталог тимијана након одвајања супернатанта)} * 100$

6.3.7. Карактеризација микрочестица

Након прописане израде, микрочестице се сликају и мери се њихова величина. За сликање је коришћен електронски микроскоп (Carl Zeiss GmbH Modcenterstraße 16 A-1034 Wien PF 14).

Суспензија микрочестица се пажљиво ставља на сахатно стакло, стави се под објектив увећања 200 пута, и када се пронађе видно поље услика се узорак. За сликање смо користили програм Axi Vision 4.6.

7. РЕЗУЛТАТИ

7.1 Резултати хемијске анализе етарских уља

Хемијски профил етарских уља приказан је именима појединих компонента а износ појединачних компонента процентним саставом (%).

У прилозима који следе дате су табеле састава за свако етарско уље, RT вредности сваке компоненте и дијаграм 3D *pie*.

У табели 7.1 су дати упоредни прикази процентног састава главних компонента испитиваних етарских уља.

Табела 7.1. Хемијски састав етарских уља

компонента	Еукалиптус	Ким	Кориандер	Коморач	Оригано	Жалфија	Тимијан
монотерпенски угљоводоници	52.81	53.01	52.29	27.77	9.40	11.25	15.38
α -Pinene	12.21	13.25	11.96	4.33	0.31	2.63	1.2
α -Phellandrene	1.08	0.655	0.595	1.77	0.27	-	0.08
α -Terpinene	0.98	1.05	0.98	0.09	0.88	-	1.75
β -Pinene	0.97	1.1	0.97	0.55	1.54	0.88	0.39
Camphene	0.18	0.21	0.18	0.1	0.2	3.04	2.09
δ -Carene	0.48	0.5	0.49	-	-	-	-
γ -Terpinene	2.86	2.96	2.91	0.15	4.64	-	6.98
Limonene	30.96	29.85	31.1	4.69	0.69	0.43	0.7
Myrcene	1.74	1.93	1.74	0.51	0.53	0.34	1.64
Sabinene	1.09	1.23	1.09	0.05	-	-	-
Terpinolene	0.26	0.27	0.27	-	0.12	-	0.46
L-Fenchone	-	-	-	15.53	-	-	-
δ -Elemene	-	-	-	-	0.22	-	-
Pseudolimonene	-	-	-	-	-	-	0.09
Humulene	-	-	-	-	-	2.41	-
Carvone	-	-	-	-	-	0.71	-
Salvin	-	-	-	-	-	0.81	-
ароматични монотерпенски угљоводоници	22.25	25.60	23.12	1.21	9.66	0.58	21.15
<i>p</i> -Cymene	22.25	25.60	23.12	0.38	5.02	-	21.15
<i>p</i> -Anisaldehyde	-	-	-	0.83	-	-	-
β -Caryophyllene	-	-	-	-	4.38	-	-
<i>o</i> -Cymene	-	-	-	-	-	0.58	-

Cuminaldehyde	-	-	-	-	0.26	-	-
оксидовани монотерпени	23.87	19.98	23.31	6.59	75.76	72.07	53.51
4- (1-Methylethyl)-2-cyclohexen-1-one	0.14	0.11	0.15	-	-	-	-
6-Methyl-5-hepten-2-one	0.17	0.17	0.16	-	-	-	-
α -Terpineol	2.2	2.03	2.31	-	1.04	0.04	0.95
Camphor	0.28	0.27	0.3	0.16	0.39	15.47	-
Eucalyptol	20.66	16.98	19.64	-	1.59	-	4.74
Isopropenyltoluene	0.18	0.18	0.18	-	-	-	-
Linalol	0.24	0.24	0.26	-	2.69	1.38	5.9
2,5-Dimethylhexa-2,4-diene	-	-	0.12	-	-	-	-
6-Hepten-1-ol	-	-	0.19	-	-	-	-
Estragole	-	-	-	6.43	-	-	-
3-Octanol	-	-	-	-	0.1	-	-
3-Octanone	-	-	-	-	0.2	-	-
4-Carvomenthenol	-	-	-	-	1.47	-	0.61
4-Thujanol, stereoisomer	-	-	-	-	0.07	-	-
α -Copaene	-	-	-	-	0.17	-	-
β -ELEMENE	-	-	-	-	0.03	-	-
β -Fenchyl alcohol	-	-	-	-	0.38	-	-
Carvacrol	-	-	-	-	59.03	3.32	2.34
CARVACROL METHYL ETHER	-	-	-	-	0.63	-	-
Carvone	-	-	-	-	0.11	-	-
Eugenol	-	-	-	-	0.42	-	-
Isoborneol (Isomer 2)	-	-	-	-	1.67	-	0.96
<i>p</i> -Isopropenyl toluene	-	-	-	-	0.08	-	-
Thymol	-	-	-	-	5.69	1.91	36.12
1,4-Cineole (Isocineole)	-	-	-	-	-	-	-
cis- <i>b</i> -Terpineol	-	-	-	-	-	-	-
γ -Terpineol	-	-	-	-	-	-	-
Isoborneol (isomer 1)	-	-	-	-	-	-	0.58
Menthone	-	-	-	-	-	0.94	-
Geraniol	-	-	-	-	-	0.21	0.32
Geranyl acetate	-	-	-	-	-	-	0.69
Nerol	-	-	-	-	-	-	0.3
1,8-Cineole	-	-	-	-	-	0.58	-
α -thujone	-	-	-	-	-	29.90	-
β -thujone	-	-	-	-	-	13.68	-
Menthol	-	-	-	-	-	1.63	-
Borneol	-	-	-	-	-	1.80	-
Nerol	-	-	-	-	-	0.03	-
Farnesol	-	-	-	-	-	0.61	-
Linalyl acetat	-	-	-	-	-	0.45	-
Geranyl acetate	-	-	-	-	-	0.07	-
Terpinene 4-ol	-	-	-	-	-	0.05	-
TERPINENE 1-OL	-	-	-	-	-	-	-

фенилпропаноиди	0.00	0.00	0.00	63.36	0.00	0.00	0.00
trans-Anethole	-	-	-	0.20	-	-	-
trans-Anethole	-	-	-	63.16	-	-	-
seskviterpenski ugljovodonići	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00
β -Caryophyllene	-	-	-	0.11	-	-	-
(-)-Zingiberene	-	-	-	0.11	-	-	-
GERMACRENE-D	-	-	-	0.04	-	-	-
моноклични сесквитерпен	0.00	0.00	0.00	0.00	2.72	5.98	4.41
α -Amorphene	-	-	-	-	0.22	-	-
α -Humulene	-	-	-	-	1.34	2.41	0.44
β -Bisabolene	-	-	-	-	0.29	-	-
δ -Cadinene	-	-	-	-	0.5	-	-
Humulene Oxide	-	-	-	-	0.07	-	-
Isoledene	-	-	-	-	0.08	-	-
Naphthalene, 1,2,3,4,6,8a--hexahydro-1-isopropyl-4,7--dimethyl-CADINA-1,4-DIENE	-	-	-	-	0.09	-	-
1- α -Bornyl acetate	-	-	-	-	-	-	-
β -Caryophyllene	-	-	-	-	-	1.34	3.38
Caryophyllene oxide	-	-	-	-	-	-	0.59
Bornyl acetate	-	-	-	-	-	2.23	-
Valencene	-	-	-	-	0.13	-	-
бициклични сесквитерпен	0.00	0.00	0.00	0.00	0.44	0.00	0.00
Caryophyllene oxide	-	-	-	-	0.38	-	-
δ -Cadinene	-	-	-	-	0.06	-	-
трициклични сесквитерпен	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08
α -Copaene	-	-	-	-	-	-	0.08
УКУПНО:	98.93	98.59	98.72	99.19	97.98	89.88	94.53

7.1.1. Резултати одређивања хемијског сатава етарског уља еукалиптуса

GC-MS анализом етарског уља еукалиптуса идентификовано је 19 једињења тј. 98.93% уља. Резултати су приказани у табели 7.2 и на сликама 7.1 и 7.2

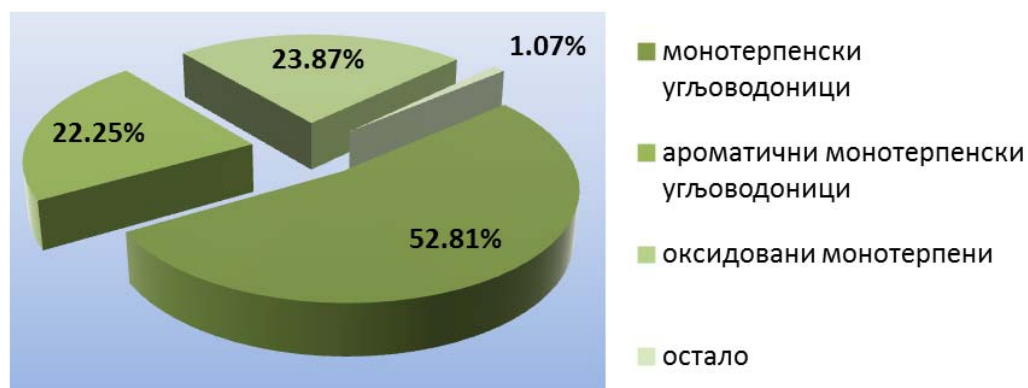
Табела 7.2. Хемијски састав етарског уља еукалиптуса

компонента	РТ	%
монотерпенски угљоводоници		52.81
α -Pinene	7.432	12.21
α -Phellandrene	9.416	1.08
α -Terpinene	9.728	0.98
β -Pinene	8.62	0.97
Camphene	7.847	0.18

δ -Carene	10.547	0.48
γ -Terpinene	10.939	2.86
Limonene	10.258	30.96
Myrcene	8.886	1.74
Sabinene	8.459	1.09
Terpinolene	11.689	0.26
ароматични монотерпенски угљоводоници		22.25
<i>p</i> -Cymene	10.074	22.25
оксидовани монотерпени		23.87
4- (1-Methylethyl)-2-cyclohexen-1-one	14.192	0.14
6-Methyl-5-hepten-2-one	8.747	0.17
α -Terpineol	14.377	2.2
Camphor	13.316	0.28
Eucalyptol	10.339	20.66
Isopropenyltoluene	11.816	0.18
Linalol	12.047	0.24
УКУПНО:		98.93

Присутност основних класа једињења у етарском уљу еукалиптуса је приказана на слици 7.1.

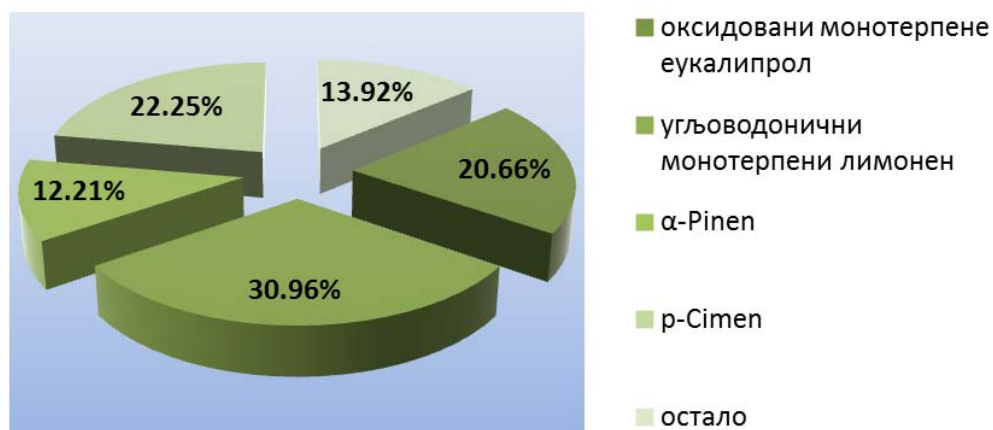
Еукалиптус



Слика 7.1. Основне класе једињења (%) у етарском уљу

Процент доминантних једињења у еукалиптусовом етарском уљу је приказан на слици 7.2.

Еукалиптус



Слика 7.2. Процентни доминантни једињења у етарском уљу еукалиптијуса.

7.1.2. Резултати одређивања хемијског састава етарског уља кима

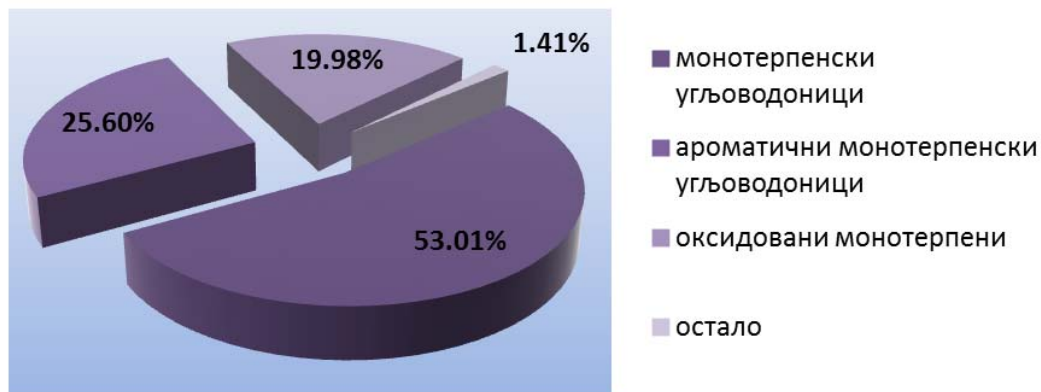
GC-MS анализом етарског уља кима идентификовано је 19 једињења тј. 98,59% уља, слике 7.3. и 7.4. и табела 7.3.

Табела 7.3. Хемијски састав етарског уља кима

компонента	RT	%
монотерпенски угљоводоници		53.01
α -Pinene	7.444	13.25
α -Phellandrene	8.309	0.655
α -Terpinene	9.739	1.05
β -Pinene	8.632	1.1
Camphene	7.859	0.21
δ -Carene	10.558	0.5
γ -Terpinene	10.951	2.96
Limonene	10.293	29.85
Myrcene	8.897	1.93
Sabinene	8.47	1.23
Terpinolene	11.689	0.27
ароматични монотерпенски угљоводоници		25.60
p-Cymene	10.109	25.60
оксидовани монотерпени		19.98
4- (1-Methylethyl)-2-cyclohexen-1-one	14.192	0.11
6-Methyl-5-hepten-2-one	8.747	0.17

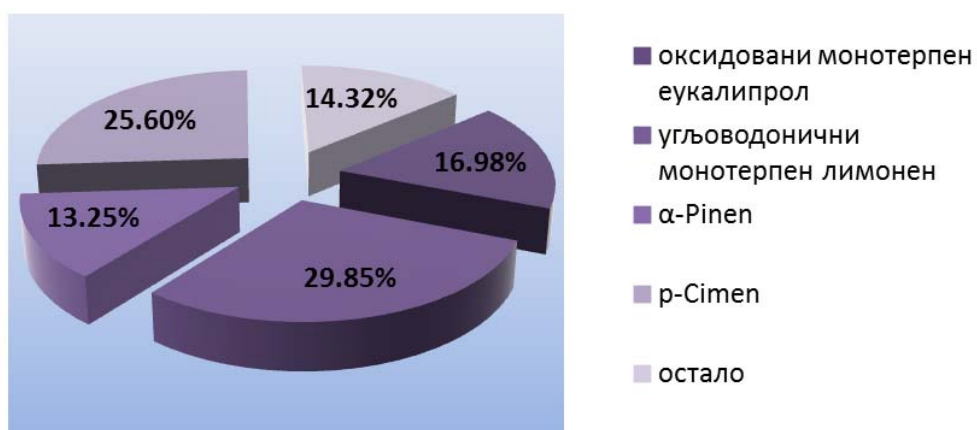
α -Terpineol	14.377	2.03
Camphor	13.316	0.27
Eucalyptol	10.362	16.98
Isopropenyltoluene	11.827	0.18
Linalol	12.058	0.24
УКУПНО:		98.59

Ким



Слика 7.3. Основне класе једињења (%) у етарском уљу кима

Ким



Слика 7.4. Процентни доминантнији групе једињења у етарском уљу кима.

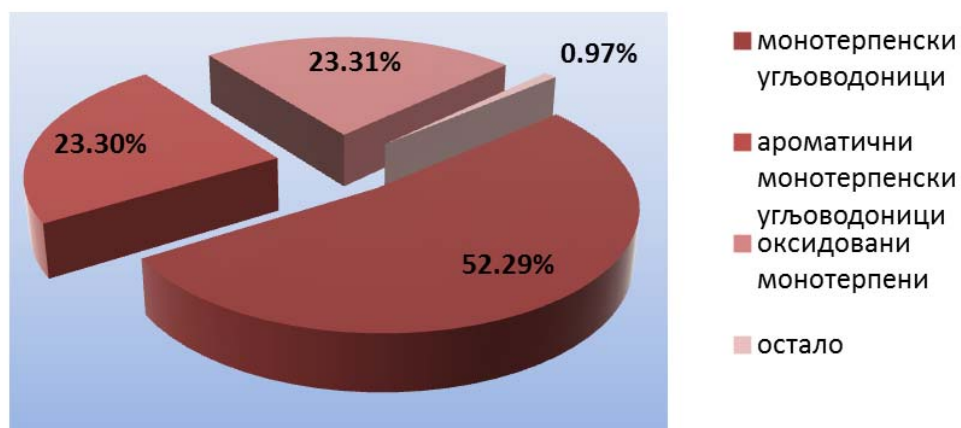
7.1.3. Резултати одређивања хемијског сатава етарског уља кориандера

GC-MS анализом етарског уља коријандера идентификовано је 21 једињења тј. 99,03% уља, слике 7.5. и 7.6. и табела 7.4.

Табела 7.4. Хемијски састав етарског уља кориандера

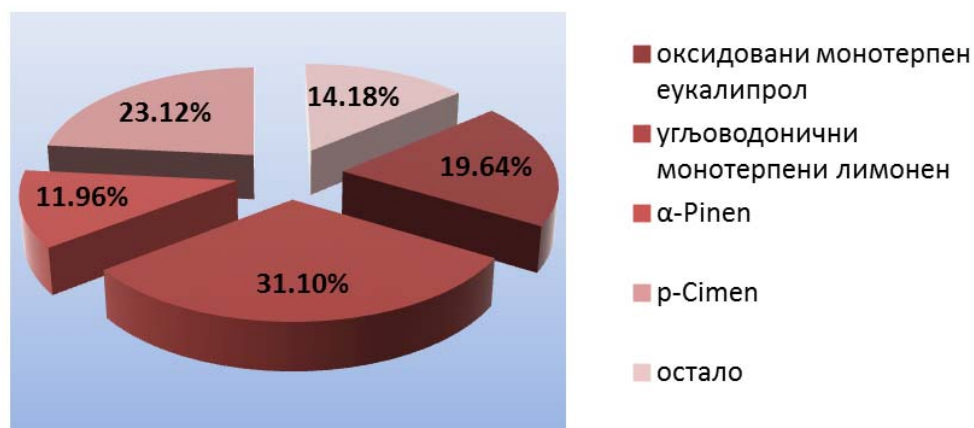
компонента	РТ	%
монотерпенски угљоводоници		52.29
α -Pinene	7.432	11.96
α -Phellandrene	8.297	0.595
α -Terpinene	9.739	0.98
β - Pinene	8.62	0.97
Camphene	7.859	0.18
δ - Carene	10.559	0.49
γ - Terpinene	10.939	2.91
Limonene	10.27	31.1
Myrcene	8.897	1.74
Sabinene	8.47	1.09
Terpinolene	11.689	0.27
ароматични монотерпенски угљоводоници		23.30
<i>p</i> -Cymene	10.086	23.12
оксидовани монотерпени		23.31
4- (1-Methylethyl)-2-cyclohexen-1-one (Cryptone)	14.192	0.15
6-Methyl-5-hepten-2-one	8.747	0.16
α - Terpineol	14.377	2.31
Camphor	13.316	0.3
Eucalyptol	10.351	19.64
Isopropenyltoluene	11.816	0.18
Linalol	12.058	0.26
2,5-Dimethylhexa-2,4-diene	16.396	0.12
6-Hepten-1-ol	9.036	0.19
УКУПНО:		99.03

Кориандер



Слика 7.5. Основне класе једињења (%) у етарском уљу коријандера

Кориандер



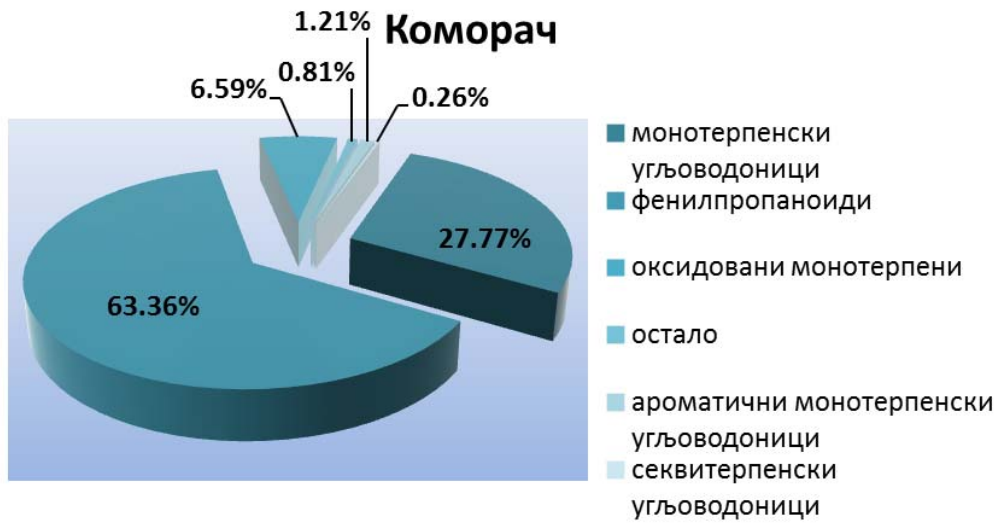
Слика 7.6. Процент најдоминантнијих група једињења у етарском уљу коријандера.

7.1.4. Резултати одређивања хемијског састава етарског уља морача

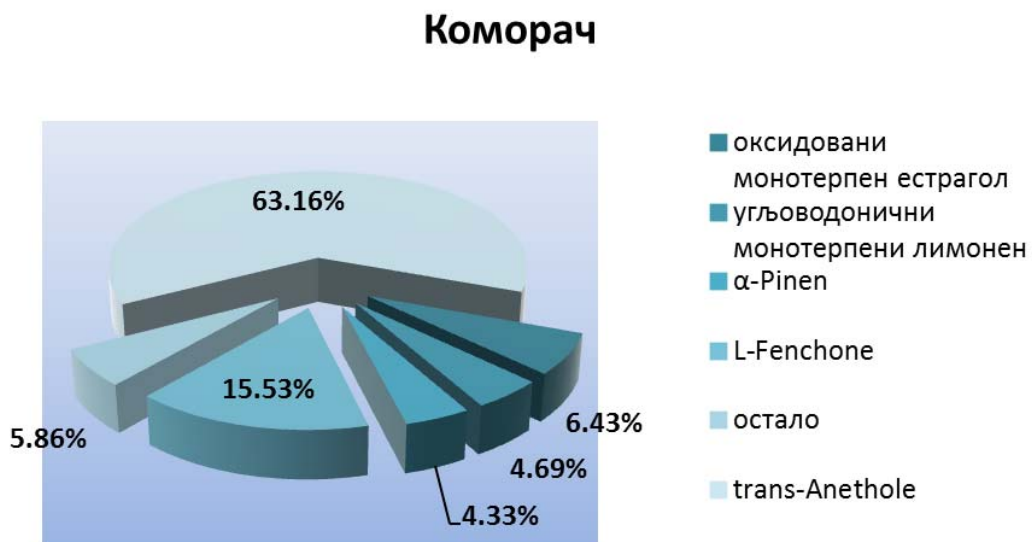
GC-MS анализом етарског уља морача идентификовано је 19 једињења тј. 99,19% уља, слике 7.7. и 7.8. и табела 7.5.

Табела 7.5. Хемијски састав етарског уља морача

компонента	РТ	%
монотерпенски угљоводоници		27.77
α -Pinene	7.409	4.33
α -Phellandrene	9.416	1.77
α -Terpinene	9.716	0.09
β -Pinene	8.62	0.55
Camphene	7.848	0.1
γ -Terpinene	10.905	0.15
Limonene	10.097	4.69
Myrcene	8.886	0.51
Sabinene	8.459	0.05
L-Fenchone	11.92	15.53
ароматични монотерпенски угљоводоници		1.21
<i>p</i> -Cymene	9.936	0.38
<i>p</i> -Anisaldehyde	15.692	0.83
оксидовани монотерпени		6.59
Camphor	13.316	0.16
Estragole	14.446	6.43
фенилпропаноиди		63.36
trans-Anethole	15.508	0.20
trans-Anethole	16.407	63.16
сесквитерпенски угљоводоници		0.26
β -Caryophyllene	18.484	0.11
(-)-Zingiberene	18.599	0.11
GERMACRENE-D	19.395	0.04
УКУПНО:		99.19



Слика 7.7. Основне класе једињења (%) у етарском уљу морача



Слика 7.8. Процентни доминантнији групе једињења у етарском уљу морача.

7.1.5. Резултати одређивања хемијског сатава етарског уља оригана

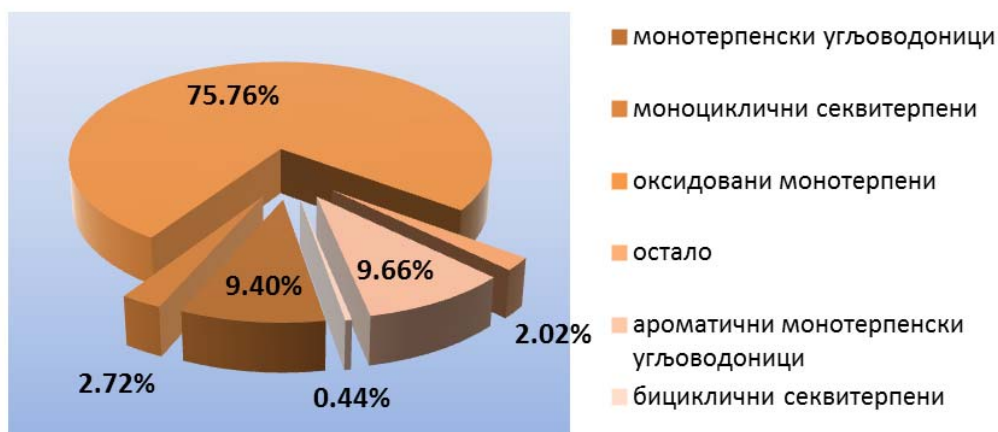
GC-MS анализом етарског уља оригана идентификовано је 41 једињења тј. 97.98% уља, слике 7.9., 7.10. и 7.11. и табела 7.6.

Табела 7.6. Хемијски састав етарског уља оригана

компонента	РТ	%
монотерпенски угљоводоници		9.40
α -Pinene	7.386	0.31
α -Phellandrene	8.292	0.27
α -Terpinene	9.716	0.88
β -Pinene	8.62	1.54
Camphene	7.847	0.2
γ -Terpinene	10.951	4.64
Limonene	10.085	0.69
Myrcene	8.886	0.53
δ -Elemene	17.25	0.22
Terpinolene	11.689	0.12
ароматични монотерпенски угљоводоници		9.66
<i>p</i> -Cymene	9.97	5.02
β -Caryophyllene	18.507	4.38
Cuminaldehyde	15.531	0.26
оксидовани монотерпени		75.76
3-Octanol	9.105	0.1
3-Octanone	8.77	0.2
4-Carvomenthenol	14.066	1.47
4-Thujanol, stereoisomer	11.297	0.07
α -Copaene	17.757	0.17
α -Terpineol	14.608	1.04
β -ELEMENE	17.953	0.03
β -Fenchyl alcohol	14.365	0.38
Camphor	13.327	0.39
Carvacrol	16.638	59.03
CARVACROL METHYL ETHER	15.208	0.63
Carvone	15.831	0.11
Eucalyptol	10.201	1.59
Eugenol	17.33	0.42
Isoborneol (Isomer 2)	13.904	1.67
Linalol	12.093	2.69
<i>p</i> -Isopropenyl toluene	11.816	0.08
Thymol	16.223	5.69

моноциклични сесквитерпен		2.72
α -Amorphene	19.268	0.22
α -Humulene	19.038	1.34
β -Bisabolene	19.707	0.29
δ -Cadinene	19.891	0.5
Humulene Oxide	21.253	0.07
Isoledene	19.972	0.08
Naphthalene, 1,2,3,4,6,8a--hexahydro-1-isopropyl-4,7- -dimethyl- CADINA-1,4-DIENE	20.111	0.09
Valencene	19.534	0.13
бициклични сесквитерпен		0.44
Caryophyllene oxide	20.872	0.38
δ -Cadinene	18.922	0.06
УКУПНО:		97.98

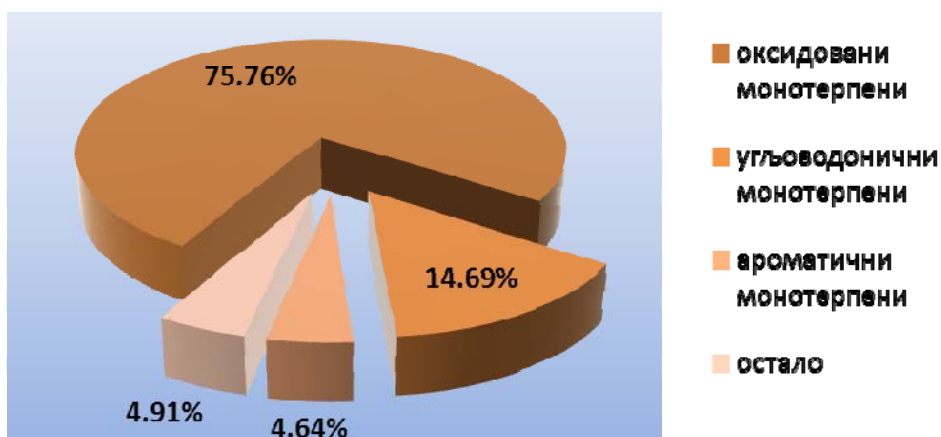
Оригано



Слика 7.9. Основне класе једињења (%) у етарском уљу оригана

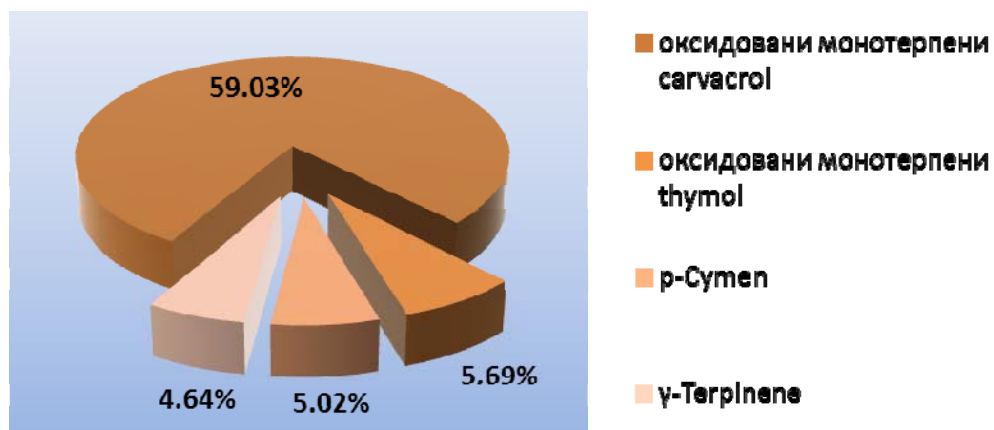
У етарском уљу оригана доминирају монотерпени (95,09%), и то оксидовани монотерпени (75,76%) у односу на угљоводоничне (14,69%) и ароматичне (4,64%). Сесквитерпена има велики број али квантитативно неупоредиво мање.

Оригано



Слика 7.10. Процентни доминантних моноштерпена у етарском уљу оригана.

Оригано



Слика 7.11. Процентни доминантних терпена једињења у етарском уљу оригана.

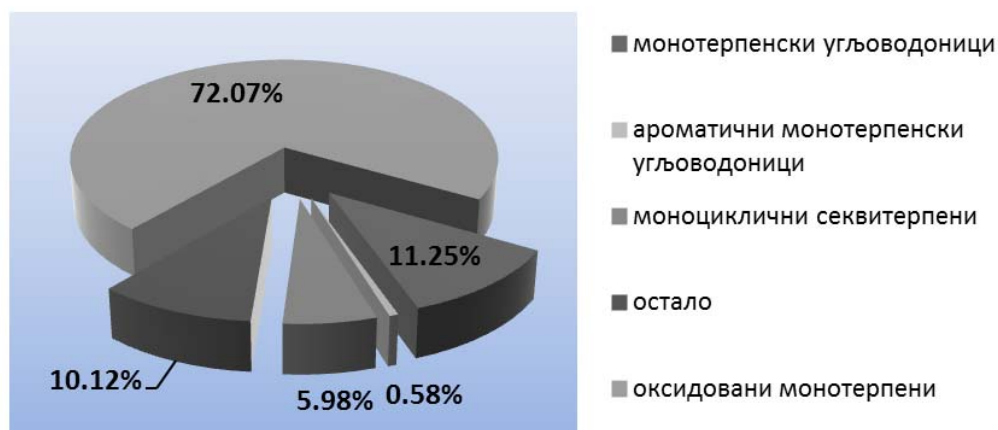
7.1.6. Резултати одређивања хемијског сатава етарског уља жалфије

GC-MS анализом етарског уља жалфије идентификовано је 29 једињења тј. 89,88% уља, слике 7.12. и 7.13. и табела 7.7.

Табела 7.7. Хемијски састав етарског уља жалфије

компонента	РТ	%
монотерпенски угљоводоници		11.25
α -Pinene	10.21	2.63
β -Pinene	10.93	0.88
Camphene	12.18	3.04
Myrcene	12.66	0.34
Humulene	40.18	2.41
Limonene	13.20	0.43
Carvone	28.20	0.71
Salvin	54.60	0.81
ароматични монотерпенски угљоводоници		0.58
<i>o</i> -Cymene	16.08	0.58
оксидовани монотерпени		72.07
1,8-Cineole	16.08	0.58
α -thujone	20.30	29.90
β -thujone	21.21	13.68
α -Terpineol	25.24	0.04
Camphor	23.20	15.47
Menthol	24.20	1.63
Borneol	24.32	1.80
Nerol	27.50	0.03
Geraniol	29.28	0.21
Thymol	32.00	1.91
Farnesol	43.12	0.61
Carvacrol	56.75	3.32
Linalyl acetat	29.10	0.45
Geranyl acetate	36.32	0.07
Linalol	19.50	1.38
Menthone	20.00	0.94
Terpinene 4-ol	23.64	0.05
моноциклични сесквитерпен		5.98
Bornyl acetate	30.10	2.23
α -Humulene	40.18	2.41
β -Caryophyllene	46.23	1.34
УКУПНО:		89.88

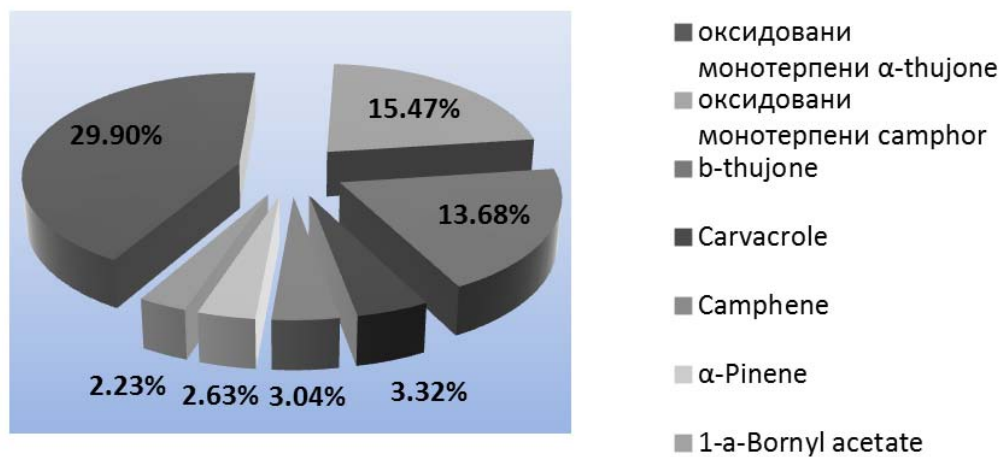
Жалфија



Слика 7.12. Основне класе једињења (%) у етарском уљу жалфије

У етарском уљу жалфије доминирају монотерпени и то оксидовани монотерпени (72,07%) у односу на угљоводоничне (11,25%). Сесквитерпена има знатно мање (5,98%).

Жалфија



Слика 7.13. Процент најдоминантнијих група једињења у етарском уљу жалфије.

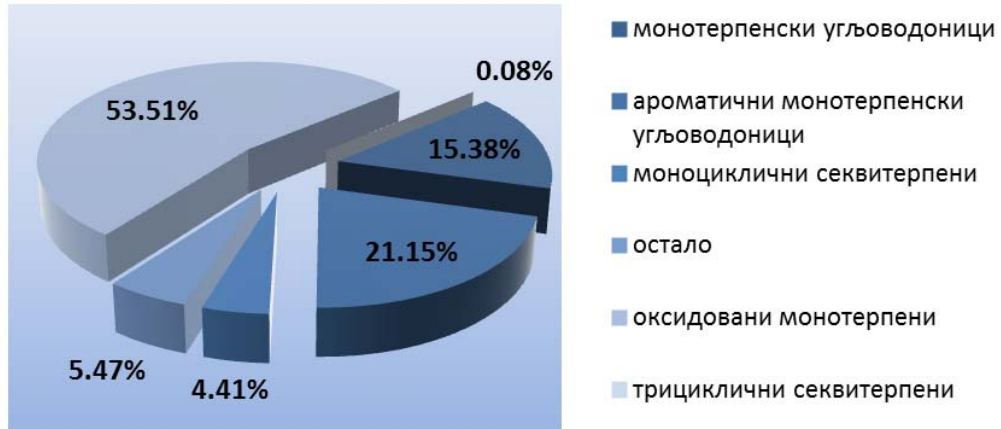
7.1.7. Резултати одређивања хемијског састава етарског уља тимијана

GC-MS анализом етарског уља тимијана идентификовано је 26 једињења тј. 94.53% уља, слике 7.14.-7.16. и табела 7.8.

Табела 7.8. Хемијски састав етарског уља тимијана

компонента	РТ	%
монотерпенски угљоводоници		15.38
α -Pinene	7.398	1.2
α -Phellandrene	9.416	0.08
α -Terpinene	12.162	1.75
β -Pinene	12.087	0.39
Camphene	7.859	2.09
γ -Terpinene	10.974	6.98
Limonene	10.132	0.7
Myrcene	8.897	1.64
Terpinolene	11.689	0.46
Pseudolimonene	9.347	0.09
ароматични монотерпенски угљоводоници		21.15
<i>p</i> -Cymene	10.051	21.15
оксидовани монотерпени		53.51
4-Carvomenthenol	14.066	0.61
α -Terpineol	14.492	0.95
Carvacrol	22.054	2.34
Eucalyptol	10.247	4.74
Geraniol	15.658	0.32
Geranyl acetate	17.653	0.69
Isoborneol (isomer 1)	13.696	0.58
Isoborneol (Isomer 2)	13.893	0.96
Linalol	12.127	5.9
Nerol	15.115	0.3
Thymol	16.361	36.12
моноциклични сесквитерпен		4.41
α -Humulene	19.038	0.44
β -Caryophyllene	18.496	3.38
Caryophyllene oxide	20.872	0.59
трициклични сесквитерпен		0.08
α -Copaene	17.746	0.08
УКУПНО:		94.53

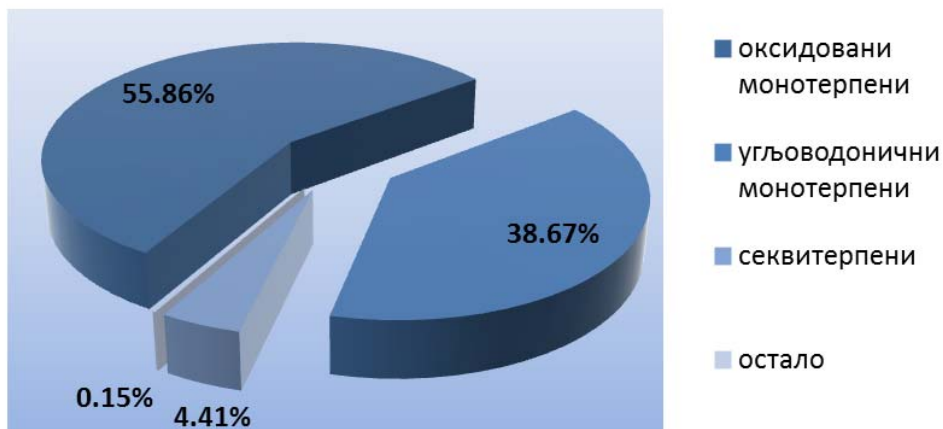
Тимијан



Слика 7.14. Основне класе једињења (%) у етарском уљу тимијана

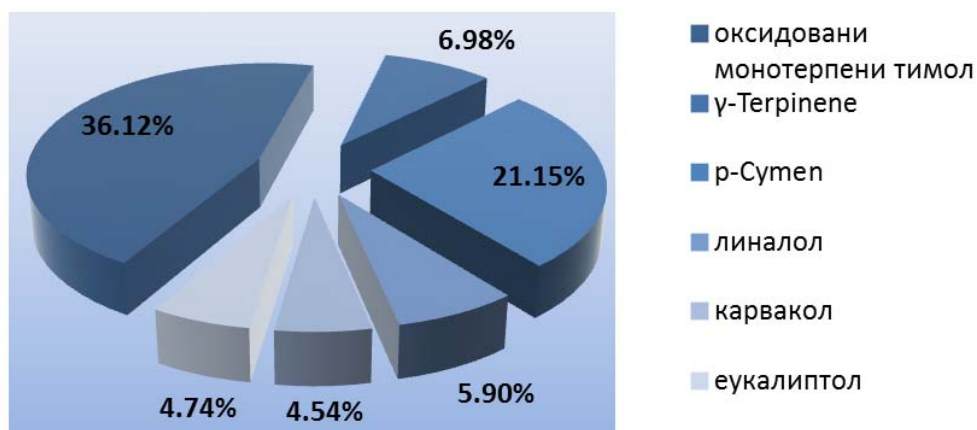
У етарском уљу тимијана доминирају монотерпени (94,08%), и то оксидовани монотерпени (55,86%) у односу на угљоводоничне (38,67%). Сесквитерпена има знатно мање.

Тимијан



Слика 7.15. Процент доминантних монотерпена у етарском уљу тимијана.

Тимијан



Слика 7.16. Процент доминантних терпена једињења у етарском уљу тимијана.

7.3. Резултати израде хитозанских честица са етарским уљем тимијана

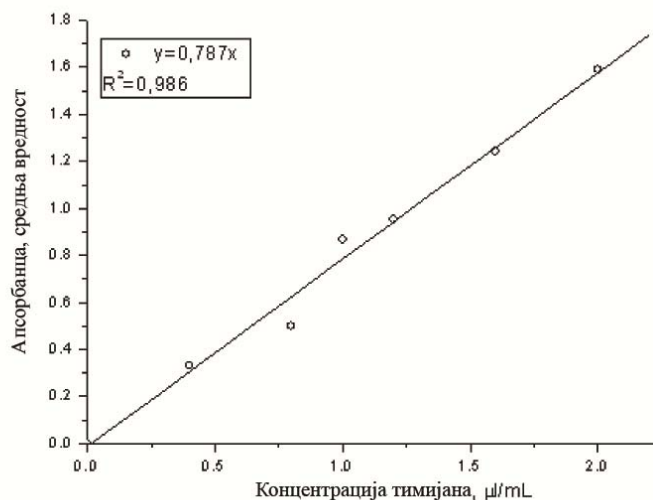
У табели 7.9 су дати подаци, неопходни за цртање графика за баждарну криву

Табела 7.9. Измерене вредности апсорбације за различите концентрације тимијана.

C (тимијана, µl/ml)	A1	A2	Asr	STD (%)
0	0	0	0	0
0,4	0,33	0,33	0,33	0,07
0,8	0,49	0,49	0,49	0,21
1	0,86	0,87	0,86	0,84
1,2	0,95	0,95	0,95	0,21
1,6	1,24	1,24	1,24	0,07
2	1,60	1,57	1,58	2,00

На слици 7.17. приказана је баждарна крива за одређивање укупних полифенола.

Једначина баждарене криве је: $A = 0,7866 \cdot C$. На основу баждарене криве се израчунава концентрација полифенола у узорку.



Слика 7.17. Стандардна крива за FC методу. На ајсцису се нанесу вредности концентрације тимијана ($\mu\text{l/ml}$), а на ординату вредности измерених средњих вредности апсорбанци на шаласној дужини од 765 nm.

7.4. Одређивање степена инкапсулације и зајремине заосталој тимијана у честицама

У циљу одређивања степена инкапсулације тимијана, вршена су мерења апсорбанци прве и треће серије честица. Узорци су припремљени према процедури за FC методу одређивања укупних полифенола.

Хитозанске микрочестице при варирању концентрације етарског уља:

Табела 7.10. Израчунавање степена инкапсулације за честице прве серије, при промени почетне концентрације тимијана

TP (%)	Ctp ($\mu\text{l/ml}$)	Vpt (μl)	Vsn (ml)	Vis (ml)	Asr	STD (%)	SI (%)
0,3	3	150	50	300,0	0,52	4.70	77.89
0,6	6	300	47,5	327,2	1,02	13.48	79.32
1,2	12	600	37	400,0	1,66	6.77	86.91
1,5	15	750	46,5	299,02	1,83	7.19	85.56

Asr-апсорбанца сувернајанија, Vpt-почетна зајремина тимијана, Ctp-концентрација тимијана у парафину, Vsn-зајремина сувернајанија, Vis-зајремина испирка, TP, %- проценат тимијана осталој у парафину

C1 (отпушеног тимијана у супернатанту) = $Asr1/Nagib = 0,52 / 0,7866 = 0,66 \mu\text{l/ml}$

C2 (отпушеног тимијана у супернатанту) = $Asr2/Nagib = 1,02 / 0,78666 = 1,30 \mu\text{l/ml}$

C3 (отпушеног тимијана у супернатанту) = $Asr3/Nagib = 1,66 / 0,7866 = 2,12 \mu\text{l/ml}$

C4 (отпушеног тимијана у супернатанту) = $Asr4/Nagib = 1,83 / 0,7866 = 2,32 \mu\text{l/ml}$

V1 (запремина отпушеног тимијана у супернатант) = C1 (отпушеног тимијана) * V1 (супернатанта) = $0,66 \mu\text{l/ml} * 50\text{ml} = 33,16 \mu\text{l}$

V2 (запремина отпушеног тимијана у супернатант) = C2 (отпушеног тимијана) * V2 (супернатанта) = $1,30 \mu\text{l/ml} * 47,5 \text{ ml} = 62,04 \mu\text{l}$

V3 (запремина отпушеног тимијана у супернатант) = C3 (отпушеног тимијана) * V3 (супернатанта) = $2,12 \mu\text{l/ml} * 37 \text{ ml} = 78,52 \mu\text{l}$

V4 (запремина отпушеног тимијана у супернатант) = C4 (тимијана) * V4 (супернатанта) = $2,32 \mu\text{l/ml} * 46,5\text{ml} = 108,26 \mu\text{l}$

Степен инкапсулација биоактивне компоненте = (почетна запремина тимијана - запремина исцурелог тимијана у супернатант) / почетна запремина тимијана

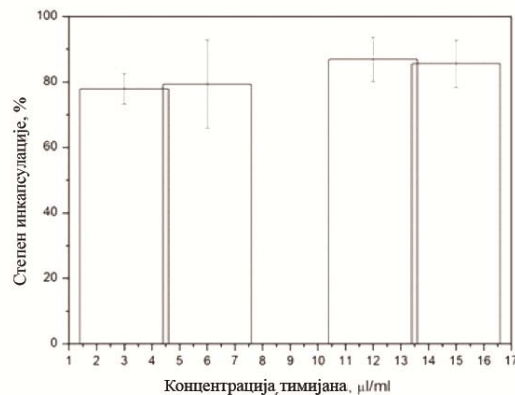
$SI_1 = (150 \mu\text{l} - 33,16 \mu\text{l}) / 150 \mu\text{l} = 0,7789$; $SI_1 (\%) = 0,77890 * 100 \% = 77.89$

$SI_2 = (300 \mu\text{l} - 62,04 \mu\text{l}) / 300 \mu\text{l} = 0,7931$; $SI_1 (\%) = 0,79317 * 100 \% = 79.31$

$SI_3 = (600 \mu\text{l} - 78,52 \mu\text{l}) / 600 \mu\text{l} = 0,8691$; $SI_1 (\%) = 0,86911 * 100 \% = 86.91$

$SI_4 = (750 \mu\text{l} - 108,26 \mu\text{l}) / 750 \mu\text{l} = 0,8556$; $SI_1 (\%) = 0,85564 * 100 \% = 85.56$

Ради боље прегледности резултати су приказани на слици 7.18.



Слика 7.18. Зависност степена инкапсулације тимијана у хитозанске микрочестице од концентрације тимијана

Из прорачуна се види да се да повећањем почетне концентрације тимијана повећава и степен инкапсулације биоактивне компоненте у хитозанске микрочестице.

Табела 7.11. Количина преосијалој тимијана у честицама

Asr	Cot (µl/ml)	Vot (µl)	Остало тимијана у честицама
0.035	0.045	13.54	103.29
0.035	0.045	14.77	223.18
0.056	0.072	28.73	492.74
0.055	0.070	20.91	620.82

Asr - апсорбена испирка, Cot - концентрација отпушеног тимијана у току испирања, Vot - отпушеног тимијана приликом испирања честица

C1 (отпушеног тимијана у току испирања) = Asr/Nagib = 0,0355/0,7866 = 0,045 µl/ml

C2 (отпушеног тимијана у току испирања) = Asr/Nagib = 0,0355/0,7866 = 0,045 µl/ml

C3 (отпушеног тимијана у току испирања) = Asr/Nagib = 0,0565/0,7866 = 0,071 µl/ml

C4 (отпушеног тимијана у току испирања) = Asr/Nagib = 0,055/0,7866 = 0,069 µl/ml

V1 (Укупно отпушеног тимијана приликом испирања честица) = C1 (отпушеног тимијана у току испирања) * V1 испирка = 0,045 µl/ml * 300 ml = 13,53 µl

V2 (Укупно отпушеног тимијана приликом испирања честица) = C2 (отпушеног тимијана у току испирања) * V2 испирка = 0,045 µl/ml * 327,2 ml = 14,76 µl

V3 (Укупно отпушеног тимијана приликом испирања честица) = C3 (отпушеног тимијана у току испирања) * V3 испирка = 0,071 µl/ml * 400 ml = 28,73 µl

V4 (Укупно отпушеног тимијана приликом испирања честица) = C4 (отпушеног тимијана у току испирања) * V4 испирка 0,069 µl/ml * 299,02 ml = 20,90 µl

V (Остало тимијана у честицама)1 = почетна запремина тимијана – [V1 (запремина отпушеног тимијана у супернатанту) + V1 (запремина отпушеног тимијана приликом испирања честица)] = 150 µl – 33,16 µl – 13,53 µl = 103,29 µl

V (Остало тимијана у честицама)2 = почетна запремина тимијана – [V2 (запремина отпушеног тимијана у супернатанту) + V2 (запремина отпушеног тимијана приликом испирања честица)] = 300 µl – 62,04µl – 14,76 µl = 223,18 µl

V (Остало тимијана у честицама)3 = почетна запремина тимијана – [V1 (запремина отпушеног тимијана у супернатанту) + V3 (запремина отпушеног тимијана приликом испирања честица)] = 600 µl – 78,52µl – 28,73µl = 492,73

V (Остало тимијана у честицама)⁴ = почетна запремина тимијана – [V_4 (запремина отпуштеног тимијана у супернатанту) + V_4 (запремина отпуштеног тимијана приликом испирања честица)] = 750 μl – 108,26 μl – 20,90 μl = 620,82 μl

Хитозанске микрочестица у којима је варирана концентрација глутаралдехида:

Табела 7.12. Вредности сљедеће инкапсулације, за хитозанске микрочестица у којима је варирана концентрација глутаралдехида.

% GA	V_s (ml)	A_{sr}	STD (%)	C_{sp} ($\mu\text{l/ml}$)	V_{sp} (μl)	Vot (μl)	SI (%)
2	44	2.002	0,07	2,54	111,99	638.01	85.07
3	42	1.975	0,07	2,51	105,45	644.55	85.94
5	43	2.34	0,85	2,97	127,92	622.08	82.94
8	39.5	2.226	0,06	2,83	111,78	638.22	85.09

C_{sp} - концентрација тимијана у супернатанту, V_s - запремина супернатанта, A_{sr} - апсорбанца супернатанта, V_{sp} - запремина тимијана која је сирана, Vot - запремина осталог тимијана након одвајања супернатанта, SI - сљедеће инкапсулације

На исти начин као претходно описан израчунати су степени инкапсулације. На основу добијених резултата, који су приближне вредности, закључујемо да концентрација глутаралдехида не утиче на степен инкапсулације.

7.5. Кинетика отпуштања биоактивне компоненте (полифенола) из микрочестица

Кинетика отпуштања полифенола из микрочестица у околни медијум праћена је преко промене концентрације укупних полифенола у току времена (ФС метода).

7.5.1. Кинетика отпуштања полифенола - ФС метода

Узорци за праћење кинетике отпуштања полифенола из микрочестица припремљени су као што је описано у одељку 6.4.3. Затим су добијени резултати приказани табеларно и графички у следећим табелама и сликама, табела 7.13. – 7.14., и слике 7.19. - 7.20.

Утицај концентрације тимијана на степен инкапсулације

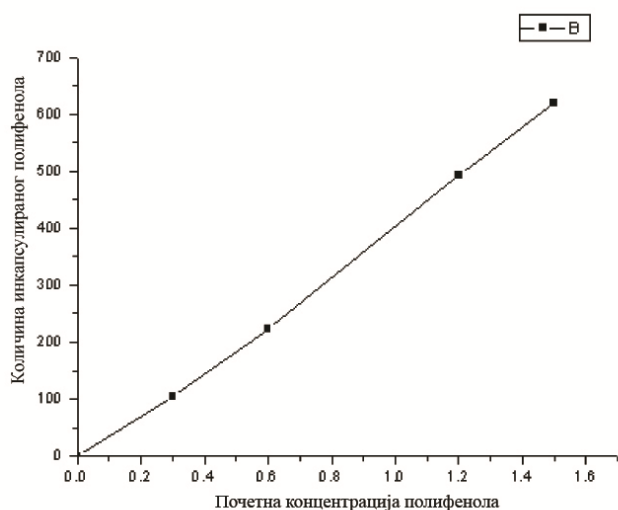
Узорци су припремљени као што је описано у одељку 6.3.1., а коришћена је прва серија честица, хитозанске микрочестице са инкапсулираним тимијаном, при чему је варирана његова концентрација.

У табели 7.13. приказани су експериментални резултати добијени мерењем апсорбанци узорака. Количина инкапсулираног полифенола је прерачуната како је описано у поглављу 6.3.6.

Табела 7.13. Израчунања је зависности количине инкапсулираног полифенола од почетне концентрације полифенола, што је приказано табеларно и графички.

% тимијана	Vpoč (µl)	Csp (µl/ml)	Vit (µl)	SI (%)
0.3	150	0.66	33.16	77.89
0.6	300	1.30	62.04	79.32
1.2	600	2.12	78.53	86.91
1.5	750	2.33	108.26	85.56

Csp - концентрација тимијана у суспензији, Vpoč - почетна запремина тимијана, Vit - запремина исцурелог тимијана у суспензији, SI - степен инкапсулације



Слика 7.19. Количина инкапсулираног полифенола при варирању његове концентрације у хитозанским микрочестицама

Са слике 7.19. се види да се са повећавањем почетне концентрације тимијана, повећава и степен инкапсулације полифенола у хитозанске микрочестице.

Утицај концентрације глутаралдехида на проценат отпуштања тимијана

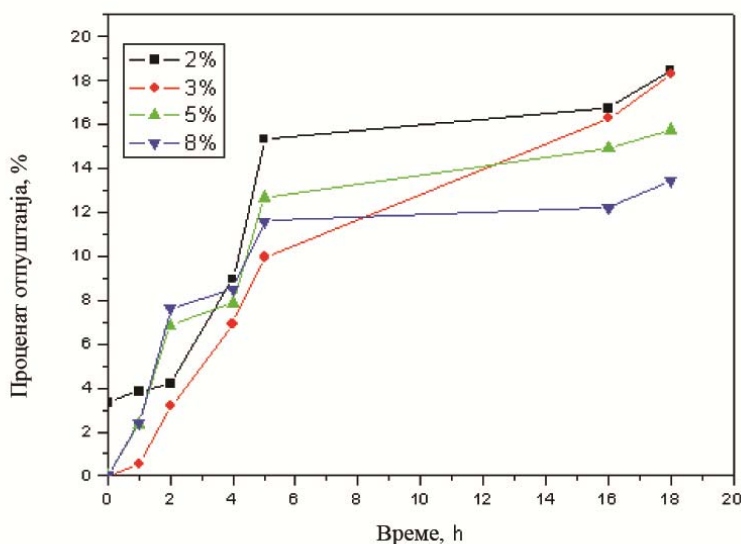
Узорци су припремљени као што је описано у одељку 6.3.1., а коришћене су честице треће серије, хитозанске микрочестице са инкапсулираним тимијаном у којима је варирана концентрација глутаралдехида.

У табели 7.14. приказани су експериментални резултати добијени мерењем апсорбанци узорака из испирка у одређеним временским интервалима. Концентрације је прерачуната како је описано у одељку 6.3.6.

Табела 7.14. Израчунаи је проценаи оиуиуиенои тимијана, за различиие концентрације глутаралдехида, у различииим временским интервалима од почетка испуштања.

Vreme (h)	2 % GA, Asr	Cis (µL/ml)	OT, (%)	3 % GA, Asr	Cis (µL/ml)	5 % GA, Asr	Cis, 5 % GA (µL/ml)	OT, (%)	8 % GA Asr	Cis, (µl/ml)	OT, (%)
0	0,03	0,04	3,34	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,03	0,04	3,83	0,01	0,01	0,02	0,03	2,35	0,02	0,03	2.35
2	0,04	0,05	4,18	0,03	0,04	0,07	0,09	6,84	0,07	0,09	6.85
4	0,09	0,11	8,96	0,07	0,08	0,08	0,10	7,86	0,08	0,10	7.87
5	0,15	0,19	15,34	0,10	0,13	0,12	0,15	12,67	0,12	0,14	12.67
16	0,17	0,21	16,73	0,16	0,21	0,18	0,15	18,90	0,12	0,15	18.90
18	0,18	0,23	18,48	0,18	0,24	0,15	0,19	15,73	0,13	0,13	13,43

OT (%) - проценаи оиуиуиенои тимијана, Asr - аисорбанца испирка, Cis - концентрација оиуиуиенои тимијана у испирку



Слика 7.20. Утицај глутаралдехида на проценаи испуштања тимијана из хитозанских микрочестица у различииим временским интервалима

Вариарирана је концентрације глутаралдехида је да би се испитао утицај глутаралдехида на проценат отпуштања тимијана из хитозанских микрочестица. Са слике 7.20. се види да концентрација глутаралдехида не утиче на проценат отпуштања тимијана. На апсису су нанете вредности за време (x), а на ординату проценат отпуштања тимијана у току времена.

7.6. Карактеризација микрочестица

7.6.1. Одређивање величине честица

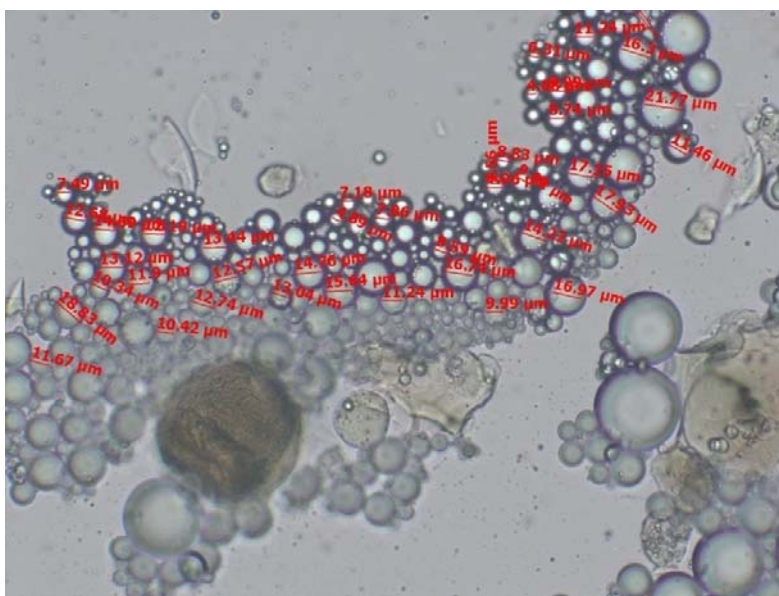
Величина хитозанских микрочестица је испитивана помоћу електронског микроскопа. Честице су припремљене као што је је описано у одељку 6.3.6. Узорци честица су снимани, и мерене су величине пречника појединачних честица у узорку. Добијени резултати су приказани у табели 7.15., док су микроскопски снимци приказани на сликама 7.21-7.24.

Табела 7.15. Израчунаше су средње вредности пречника честица:

Број честице	Пречник (1,5% тимиајан, 2% GA, μm)	Пречник (1,5% тимиајан, 3% GA, μm)	Пречник (1,5% тимиајан, 5% GA, μm)	Пречник (1,5% тимиајан, 8% GA, μm)
1	7,94	15,25	2,27	2,19
2	12,68	27,03	7,86	5,7
3	11,38	10,78	9,37	5,00
4	13,12	12,92	1,87	3,75
5	10,34	11,62	2,69	5,53
6	18,83	8,84	3,26	3,86
7	12,57	10,72	11,09	7,42
8	13,04	10,87	9,08	2,50
9	15,64	12,57	12,18	1,56
10	14,76	15,25	10,78	6,28
11	11,24	14,39	9,08	5,03
12	16,74	13,94	11,89	5,62
13	16,97	11,89	7,65	5,76
14	8,59	8,88	5,62	5,23
15	7,18	21,65	8,2	5,70
16	7,86	10,87	7,21	4,47
17	9,06	16,87	4,24	4,87
18	14,22	15,27	5,62	4,80
19	16,97	12,57	6,98	4,88
20	17,93	10,78	6,9	4,06
Средња вредност	12, 853\pm3.619^{аАЦ}	13,648\pm4.342^{аБД}	7,192\pm3.168^{бАБ}	4,710\pm1.417^{бЦД}

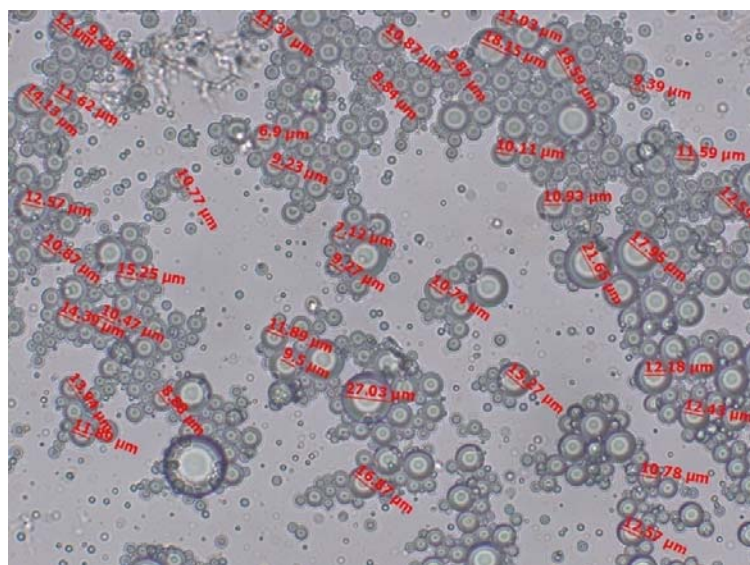
Ознака малим словима указује да разлика средњих вредности није значајна на нивоу 0.01

Ознака великим словима указује да је разлика средњих вредности значајна на нивоу 0.01



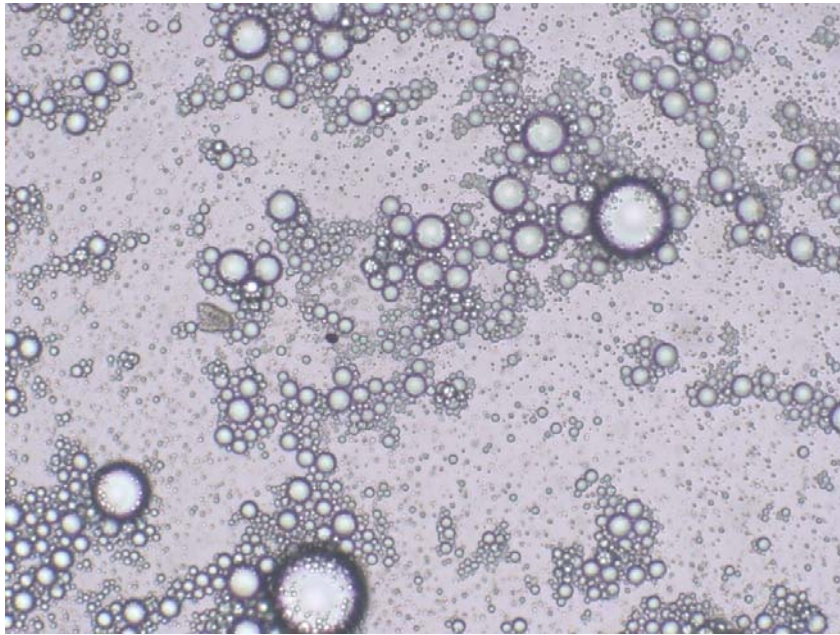
Слика 7.21. Хитозанске микрочестице са инкајсулираним 1,2 % тимијаном и 2 % глутаралдехидом

Средња величина хитозанских микрочестица са 1,2 % тимијаном и 2% глутаралдехидом износила је 12,85 μm .



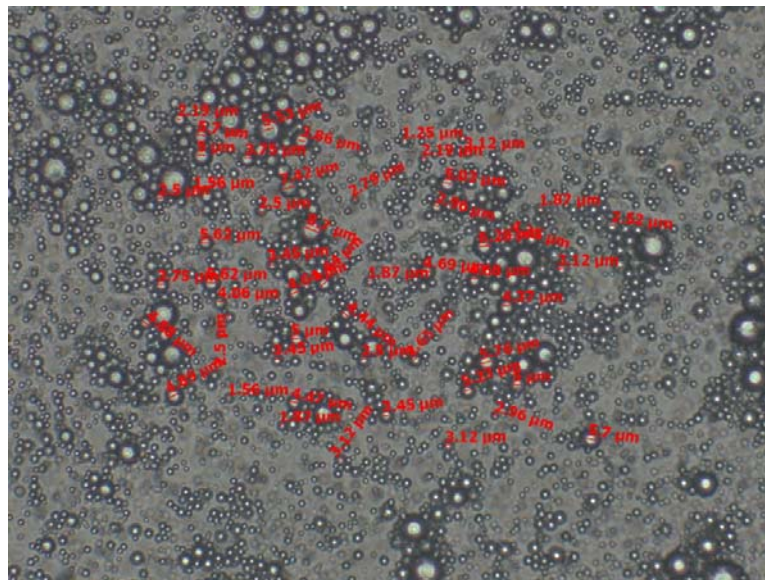
Слика 7.22. Хитозанске микрочестице са инкајсулираним 1,5 % тимијаном и 3 % глутаралдехидом

Средња вредност пречника ових честица износила је 13,64 μm .



Слика 7.23. Тимијан 1,5 %, ѓлушаралдехид 5 %

Средња величина честица износила је 7.19 μm .



Слика 7.24. Тимијан 1,2%, ѓлушаралдехид 8 %

Средња величина ових микрочестица је 4,71 μm .

Статистика је рађена у Origin 8.0, коришћена је One-way ANOVA, а за поређење средњих вредности Turkey тест са нивоом значајности 0.01

Descriptive Statistics

Величина узорка	Средња вредност	Стандардна девијација	Стандардна грешка
20	12.853	3.61935	0.80931
20	13.648	4.34231	0.97097
20	7.192	3.16752	0.70828
20	4.7105	1.41743	0.31695

Ово практично значи да нема значајне разлике у величини честица за GA 2 и 3 % као ни у величини честица за GA 5 и 8%.

Значајне разлике у величини честица (на нивоу 0.01) су за GA 2% у односу на 5% и 8%, односно у величини честица за GA 3% у односу на 5% и 8%

На основу резултата можемо закључити да се пречници микрочестица повећавају са повећањем концентрације тимијана, а смањују са повећањем концентрације глутералдехида.

7.7. Резултати антимикробног дејства етарских уља применом методе дифузије у бунарчићима

In vitro антимикробна активност етарских уља и њихово потенцијално антибактеријско дејство испитани су квалитативно и квантитативно одређивањем ширине зоне инхибиције као и одређивањем МИС вредности за свако уље. Поред тога, обзиром да се ради о вагиналним препаратима који терба да испоље антимикробно дејство, испитано је и потенцијално синергистичко дејство етарских уља и сублеталне дозе млечне киселине (50 ppm).

Резултати ових испитивања су приказани у табели 7.16., као и на сликама 7.25. - 7.27.

Табела 7.16. Антимикробна активност тесћираних етарских уља, етарских уља са млечном киселином, клиндамицина и нистатина на испитиване бактерије

Уље	Ширина зоне инхибиције, mm			
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>
Еукалиптус	3	1	2	2
Жалфија	10	3	1	1
Оригано	11	8	1	0.5
Тимјан	12	8	1	0.8
Ким	0.2	1.5-2	0.2	0
Коморач	0	-	0	0
Коријандер	0.1	-	0	0

Еукаліптус+киселина	2.5-3	3	2	3
Жалфија+киселина	10	1	1	1
Оригано+киселина	11	10	1.25	0.7
Тимјан+киселина	13	10	1.3	0.9
Ким+киселина	0.3	2	0.3	0
Коморач +киселина	0	-	0	0
Коријандер+киселина	0.1	-	0.05	0
Киселина	-	-	-	-
Нистатин (30μl/ml)	-	-	4	-
Клиндамицин (30μl/ml)*	2	2	-	2.5



Слика 7.25 Антибактеријско дејство испитиваних етарских уља на *S.aureus*



Слика 7.26. Антибактеријско дејство испитиваних етарских уља на *E.faecalis*



Слика 7.27. Антибактеријско дејство испитиваних етарских уља на *C.albicans*

Одређено је и *in vitro* антибактеријско дејство испитиваних етарских уља на лактобациле, који су нормално присутни у вагиналној флори здраве жене у репродуктивном периоду - вредности зона инхибиције су дате у табели 7.17.

Табела 7.17. Антибактеријска активност испитиваних етарских уља на *Lactobacillus* врсте

Уље	Ширина зоне инхибиције, mm			
	<i>L.casei</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.fermentum</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus LGG</i>
Еукалиптус	2	2*	2	-
Жалфија	2	2*	2 – 2.5	1.5
Оригано	15	12*	9	10
Тимијан	14	15*	10	9
Ким	1	-	2.5	-
Коријандер	1	1	1.5	1
Коморач	1	1.5	1.5	-

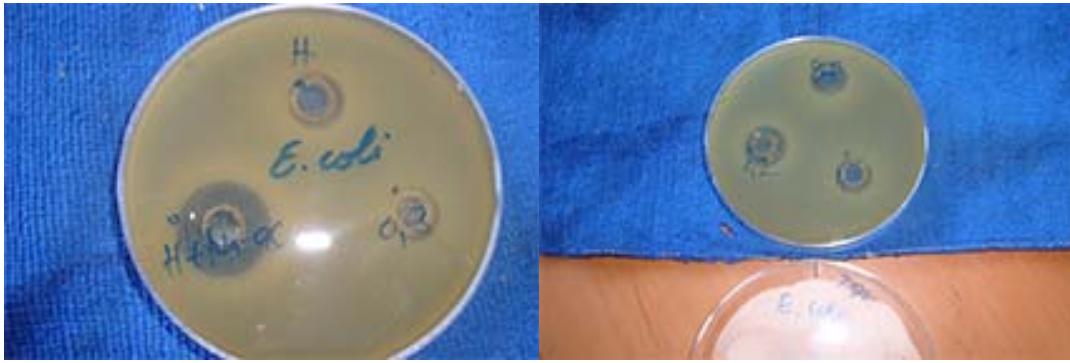
* зоне су свеиће и примећује се иораси бактерија унутар њих – дифузни раси

Истим поступком као у претходном мерењу *in vitro* антимикуробног дејства, методом дифузије у бунарчићима, одређена је и антимикуробна активност формулисаних хитозанских честица са различитим концентрацијама етарског уља тимијана, као и самог хитозана, табела 7.18. и слике 7.28. и 7.29.

Табела 7.18. Антимикробна активност хитозанских честица са различитим концентрацијама етарског уља тимијана (0.3%, 0.6%, 1.2%, 1.5%) и хитозана на испитиване бактерије

Концентрација етарског уља тимијана (%) у хитозанској честици	Ширина зоне инхибиције, mm			
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>
0,3	4	2,5	2,5	2,5
0,6	4,5	3,5	3	2,5
1,2	5	4,5	5	3
1,5	6	5	5	3,5
Хитозан 1%	2,5	2	1,5	2

На сликама 7.28. и 7.29. је приказано антибактеријско дејство формулисаних хитозанских честица са различитим концентрацијама тимијана (0,3%, 0,6%, 1,2%,1,5%), као и самог хитозана на *E.coli* и *C.albicans*.



Слика 7.28. Антибактеријско дејство хиџозанских честичица са различитим концентрацијама тимијана (0,3%, 0,6%, 1,2%, 1,5%), као и самој хиџозани на *E. coli*



Слика 7.29. Антибактеријско дејство хиџозанских честичица са различитим концентрацијама тимијана (0,3%, 0,6%, 1,2%, 1,5%), као и самој хиџозани на *C. albicans*

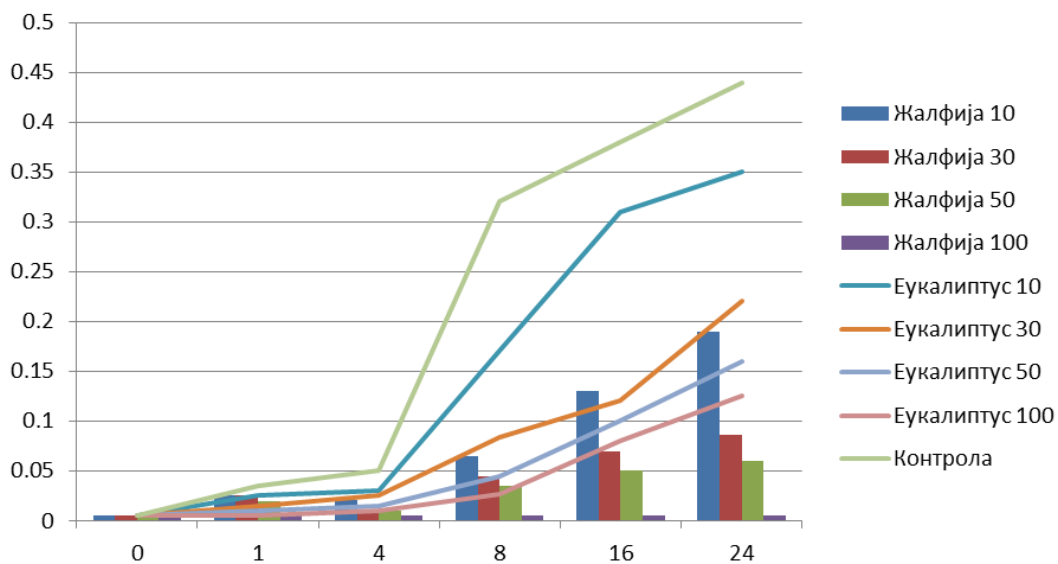
7.8. Одредивање МИС вредности

7.8.1. Кинетика раста *E. coli* у присуству етарских уља и одређивање МИС вредности

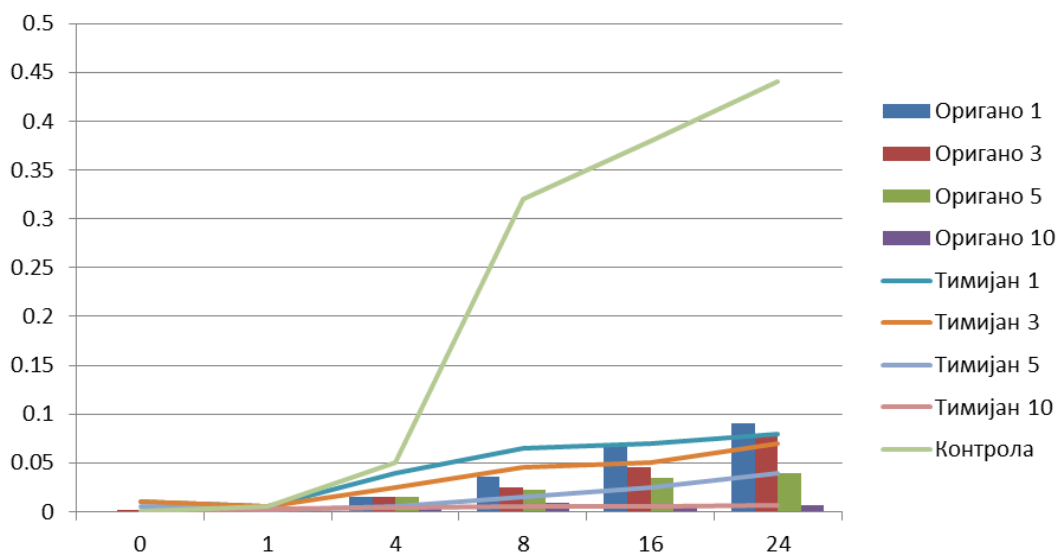
Кинетика раста микроорганизама је праћена у присуству различитих концентрација етарских уља у течной подлози (ТСБ) при чему је одређивана промена оптичке густине (OD_{570}) у току 24 h инкубације на 37°C. Примењене концентрације етарских уља су следеће:

- За етарска уља тимијана и оригана – 1, 3, 5 и 10 $\mu\text{l/ml}$
- За етарска уља жалфије и еукалиптуса – 10, 30, 50 и 100 $\mu\text{l/ml}$

Резултати су упоређени са контролном подлогом, без уља. Резултати ових испитивања, за Грам-негативну бактерију *E. coli* су приказани на слици 7.30. и 7.31.



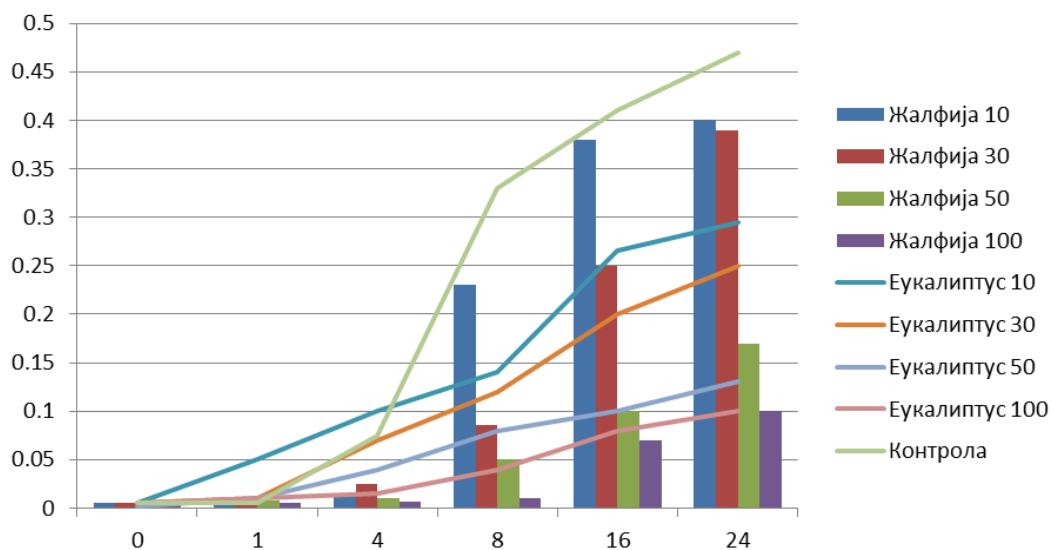
Слика 7.30. Кинетика раста *E.coli* у присуству различитих концентрација етерских уља жалфије и еукалиптус



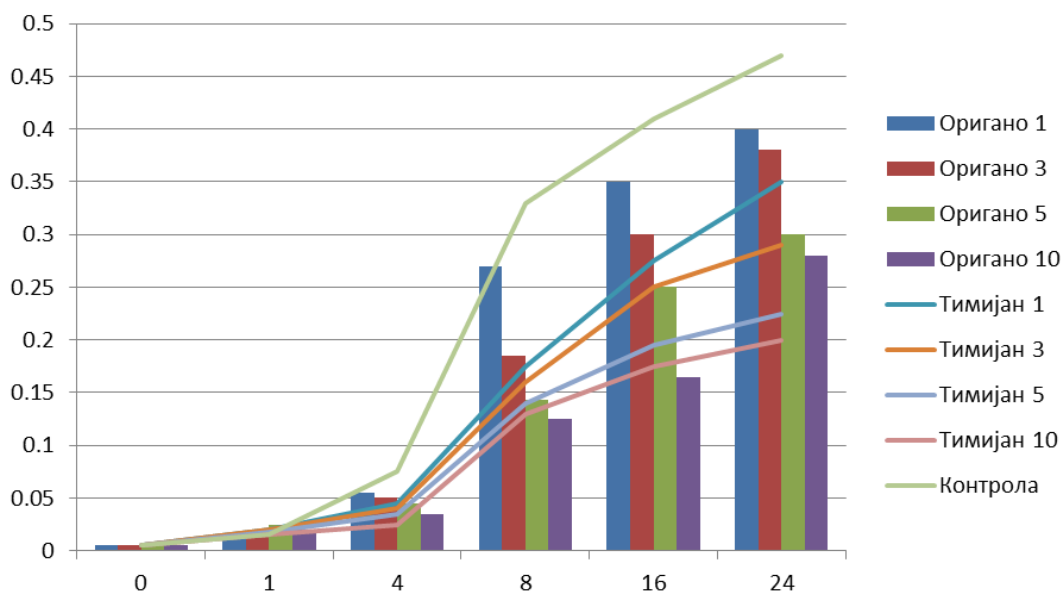
Слика 7.31. Кинетика раста *E.coli* у присуству различитих концентрација етерских уља оригана и тимијана

7.8.2. Кинетика раста *E. faecalis* у присуству етарских уља и одређивање МИС вредности

Резултати испитивања кинетике раста Грам-позитивне бактерије *E. faecalis* су приказани на слици 7.32. и 7.33.



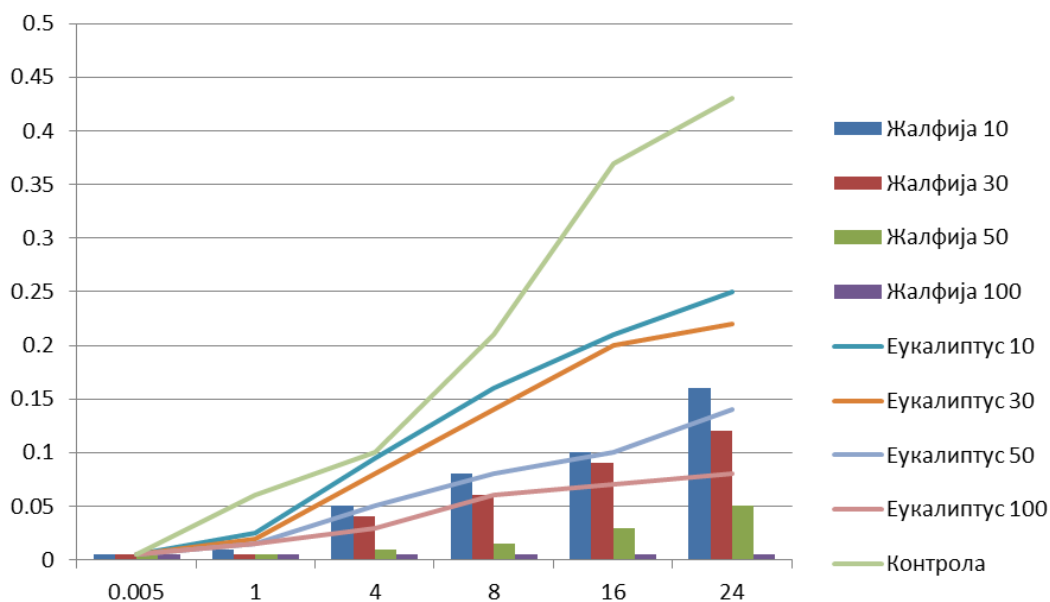
Слика 7.32. Кинетика раста *E. faecalis* у присуству различитих концентрација етарских уља жалфије и еукалиптуса



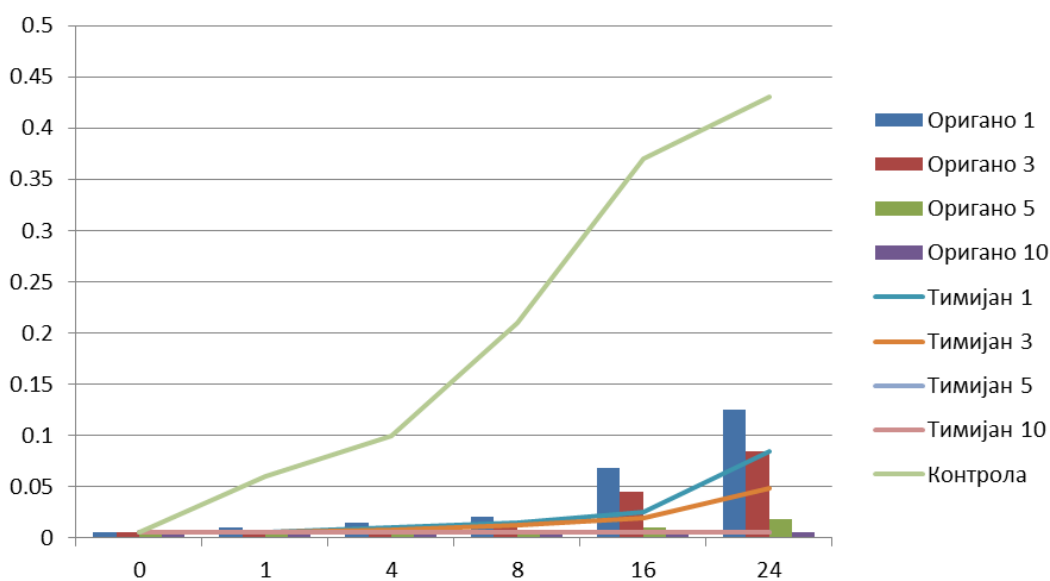
Слика 7.33. Кинетика раста *E. faecalis* у присуству различитих концентрација етарских уља оригана и тимијана

7.8.3. Кинетика раста *S. aureus* у присуству етарских уља и одређивање МИС вредности

Кинетика раста *S. aureus*, при различитим концентрацијама етарских уља је приказана на сликама 7.34. и 7.35.



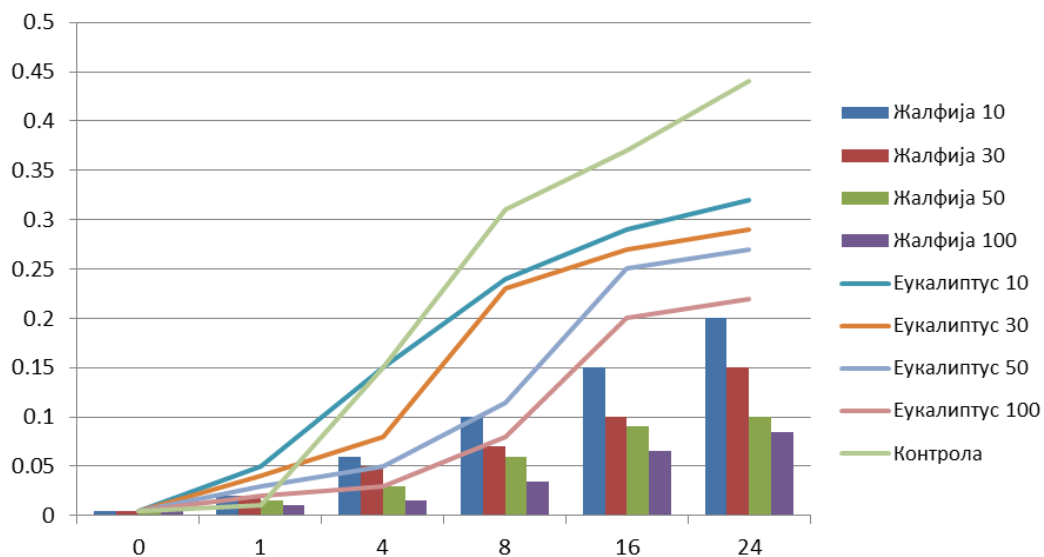
Слика 7.34. Кинетика раста *S. aureus* у присуству различитих концентрација етарских уља жалфије и еукалиптуса



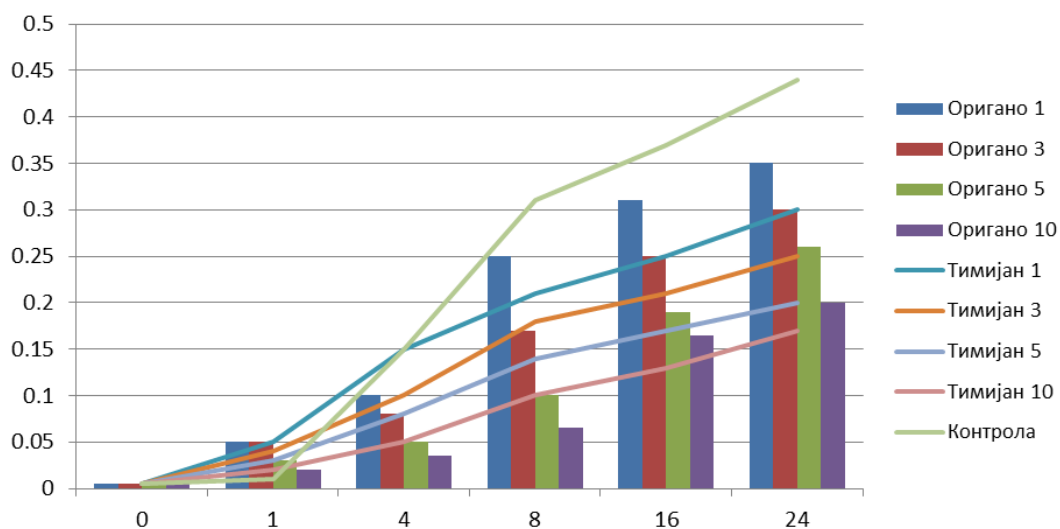
Слика 7.35. Кинетика раста *S. aureus* у присуству различитих концентрација етарских уља оригана и тимијана

7.8.4. Кинетика раста *C. albicans* у присуству етарских уља и одређивање МИС вредности

Резултати праћења раста патогене гљивице *C. albicans* су приказани на сликама 7.36. и 7.37.



Слика 7.36. Кинетика раста *C. albicans* у присуству различитих концентрација етарских уља жалфије и еукалиптуса



Слика 7.37. Кинетика раста *C. albicans* у присуству различитих концентрација етарских уља оригана и тиммијана

8. ДИСКУСИЈА

Физиолошки процеси у биљкама резултат су интеракције генотипа и животне средине. Међутим, одговарајући тип законитости, првенствено законитости у филогенетским линијама утичу на заступљеност појединих класа секундарних метаболита, етарских уља пре свега.[411].

8.1. Хемијски састав етарских уља

Хемијском анализом испитиваних етарских уља гасном хроматографијом са масеном спектрометријом (GC-MS), утврђене су главне компоненте етарских уља које су терпеноидне структуре. Најрепрезентативнија група терпена су монотерпени, који су у етарским уљима садржани у концентрацијама до 90% и имају огромну структурну разноликост. У испарљивим фракцијама углавном се налазе нижи монотерпени и једноставнији сесквитерпени. Свако етарско уље карактеришу две до три компоненте, које су заступљене у релативно високој концентрацији (20-70%) у односу на остале компоненте који се налазе у траговима (поксебно се истичу оксидовани монотерпени када су у питању биљке са изразитим антимикуробним дејством). Сви испитивани узорци се разликују квантитативно и квалитативно што је и за очекивати јер смо испитивали уља која припадају два различитим фамилијама, које обухватају 7 различитих етарских уља (ким, коријандер, коморач, еукалиптус, жалфија, оригано, тимијан).

Из резултата приказаних у табели 6.1, може се уочити да највећи проценат уља чине три класе једињења – монотерпенски угљоводоници, ароматични монотерпенски угљоводоници и оксидовани монотерпени (98,93%). Остале групе једињења су заступљена у око 1% (слика 7.1). Поред тога, може се уочити доминација појединих компоненти као што су оксидовани монотерпени карвакрол (59,03%); тимол (36,12%), еукалиптол (20,66%), угљоводонични монотерпени лимонен (30,96%) и α -пинен (12,21%) и ароматични монотерпен, *p*-цимен(22,25%) (слика 7.2).

У етарском уљу кима доминирају монотерпени (94,08%), и то најдоминантнији су ароматични монотерпен *p*-цимен(25,60%), затим угљоводонични монотерпени α -пинен (13,25%), лимонен (29,85%) и угљоводонични монотерпен еукалиптол (16,98 %), слике 7.3 и 7.4.

У етарском уљу коријандера доминирају монотерпени, и то ароматични монотерпени *p*-цимен (23,12%), оксидовани монотерпени еукалиптол (19,64%) и монотерпенски угљоводоници лимонен (31,10%) и α -пинен (11,96%), слике 7.5 и 7.6.

У етарском уљу морача доминира, ароматични монотерпен, фенилпропанског типа, транс-Анетол (63,16%), и заузима више од половине уља. Остале доминантне компоненте су оксидовани монотерпен естрагол (6,43%) и

монотерпенски угљоводоници L-fenhon (15,53%), лимонен (4,69%) и α -pinen (4,33%). Сесквитерпена има готово у траговима, слике 7.7. и 7.8.

Више од половине укупног састава етарског уља оригана чини доминантно једињење- оксидовани монотерпен карвакрол (59,03%); затим знатно мање тимол (5,69%), а затим монотерпенски угљоводоници *p*-cimen(5,02%) и γ -terpinen (4,64 %). Сесквитерпена има велики број, али квантитативно неупоредиво мање, слике 7.9.-7.11.

У етарском уљу жалфије доминира оксидовани монотерпен α -thujone (29.9%), затим камфор (15.47) и β -tujon (13.68%), карвакрол (3.32) а затим монотерпенски угљоводоници камфен (3.04%) и α -pinen (2.63%). Значајан је садржај сесквитерпенског угљоводоника 1- α -борнил ацетата (2.23%)., слике 7.12 и 7.13.

Више од половине укупног садржаја етарског уља оригана чини 6 доминантни једињена, где доминира оксидовани монотерпен тимол (36,12%), а затим монотерпенски угљоводоник *p*-cimen (21,15%). Остале доминантне компоненте овог етарског уља су γ -terpinen (6.98%), линалол (5,90%), карвакол (4,54 %) и еукалиптол (4,74%), слике 7.14.-7.16.

Ове главне компоненте етарских уља одређују биолошке и фармаколошке особине самог уља, па ће и однос хемијског састав и антимикуробне активности одређеног етарског уља бити од пресудног значаја за његово антибактеријско дејство.

8.2. Однос хемијској састава и антимикуробне активности етарских уља фамилије *Lamiaceae* и *Ariaceae*

Активност етарског уља се везује за хемијски састав самих уља, врсту и структуру њихових конституената, врсте функционалних група у њима, као и њиховог синергистичког дејства [411].

Хемијском анализом испитаних етарских уља установљено је да она преваходно садрже терпене, међу којима убедљиво доминирају монотерпенска једињења у односу на сесквитерпене.

На основу литературних података, који су приказани у табели 4.3. у уводном делу, и на основу наших резултата, може се закључити да се код већине проучених етарских уља рода *Lamiaceae* као доминантне компоненте јављају: карвакрол, тимол, *p*-цимен, γ -terpinene, линалол, α -pinene, еукалиптол, камфор. За већину ових супстанци је у многим радовима константовано антимикуробно деловање. Сара Бурт [20] је у свом раду сумирала резултате различитих аутора о механизмима антибактеријског деловања етарских уља, а то су: деградација ћелијског зида [412, 413], оштећење цитоплазматске мембране [414, 275, 415, 225, 277]; оштећење мембранских протеина [416, 417], излазак ћелијског садржаја [416, 280, 413, 417, 224], згушњавање цитоплазме [280] и нарушавање размене протона [413], електрона и активног транспорта [418, 292].

Најбољу антибактеријску активност су показала етарска уља биљних врста са највећим садржајем тимола и карвакрола: *џимијан* (тимол -36,12% тимолола и 2,34 карвакола) и *оријано* (карвакрол .– 59,63% % и тимолол 5,69%). Уље прве врсте је деловало нешто боље у односу на другу, што је у складу са

подацима о већој активности тимола у односу на карвакрол [20]. Иако су у уљима жалфије и еукалиптуса заступљене обе компоненте (тимол и карвакрол), оно делује слабије од уља поменутих врста, што наводи на закључак да на антимикуробну активност утиче и количина одређене компоненте присутне у уљу, али и њихово синергистичко деловање.

Карвакрол и тимол (слика 4.3.) су фенолна једињења која се међусобно разликују само по положају хидроксилне групе на фенолном прстену. Њихова антибактеријска активност је потврђена у многим истраживањима, и могу деловати бактериостатски и бактерицидно у зависности од концентрације у којој се користе [419].

Ова једињења су веома активна и поред њихове хидрофобности и немогућности да се растворе у води што је у складу са многим радовима [420, 421, 422, 423, 424, 314]. Положај и број хидроксилних група у фенолном прстену утиче на цитотоксичност ових једињења, што их је више и цитотоксичност је већа [425]. За једињења која немају фенолну групу, (ментол) механизам антибактеријског дејства се објашњава нарушавањем интактности ћелијске мембране од стране липофилних једињења [426]. Важност хидроксилне групе у фенолној структури је доказана поређењем карвакрола са његовим метил етром, који готово да нема антибактеријску активност. Даље је поређен положај хидроксилне групе и утицај на ефикасност једињења тимола и карвакрола на Грам позитивне и Грам негативне бактерије. Поред тога, утицај фенолног прстена на антибактеријску активност је доказан одсуством антибактеријске активности цикличног монотерпенског угљоводоника *p*-сипена. Монотерпен *p*-сипен углавном не показује добру антибактеријску активност [296, 341], али он може да се инкорпорира у цитоплазматску мембрану и да доведе до већег транспорта антимикуробних супстанци у ћелије микроорганизама [225].

Постоје многи радови који потврђују антимикуробну активност тимола и карвакрола, као главних антимикуробних конституената етарских уља фамилије *Lamiaceae*, посебно тимотијана и оригана, [427, 335, 290, 428] као и механизам њиховог деловања деловања [416, 277, 224]. Захваљујући својој липофилности, карвакрол и тимол, нарушавају интегритет ћелијске мембране бактерије тако што ремете распоред липида и стабилност липидног двослоја, при чему долази до цурења ћелијског материјала кроз њу пасивним транспортом, као што су јони, АТФ, нуклеинске киселине [271, 224, 273, 416]. Степен оштећења мембране бактеријске ћелије зависи од хидрофобности компонената етарског уља која се може експериментално детерминисати као парциони коефицијент и у директној је корелацији са $\log P$ – расподелом липофилних компоненти у октанолу/води (*partitioning behaviour of the lipophilic compounds in octanol/water*), и њиховој расподели у цитоплазматској мембрани микроорганизама [429]. Такав ефекат изазивају компоненте које имају $\log P > 3$, што је случај код карвакрола и тимола који имају $\log P > 3,64$ и $3,30$, али не и код еугенола и метилетра карвакрола чиме се објашњава и њихово слабије деловање [20, 429].

Експеримент *in vitro* са *B. cereus* показује да карвакрол делује на ћелијску мембрану тако што се раствара у фосфолипидном двослоју и умеће између ланаца масних киселина [277]. То је и потврђено снимцима на SEM-у за деловање уља оригана и чистог тимола на *B. subtilis* и *E. coli* [427] и за деловање тимола на *S. cerevisiae* [335]. Оваква врста интракције карвакрола са ћелијском мембраном бактерија доводи до промене пермеабилитета мембране и омогућава пасиван транспорт јона, тако да јони натријума [416] и фосфатни јони [224] излазе из ћелије. Такође је показано да у присуству карвакрола долази до снижења АТФ-“pool-a“ у

ћелији што упућује на закључак да се , или смањила његова синтеза, или повећала његова хидролиза [277]. Доказано је да у присуству карвакрола долази до снижења мембранског потенцијала код ћелија у експоненцијалној фази раста што индицира да је дошло до снижења протока протона, рН градијент слаби и потпуно нестаје [277]. Осим тога што инхибише раст вегетативних ћелија, карвакрол инхибише и продукцију токсина код микроорганизама изолованих из хране, нпр. код *B. cereus* инхибише продукцију дијареалног токсина. То се објашњава уз помоћ две теорије: а) ако је излучивање токсина из ћелија активан процес, онда инсуфицијенција АТП-а може да га онемогућава; б) ако ћелије троше сву расположиву енергију да би остале вијабилне , онда живе сувише кратко да би продуковале токсине [277].

Добра антимикуробна активност етарских уља родова *Origanum* и *Thymus*, против *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* и *Salmonella typhimurium*, се заснива на високом садржају тимола и карвакрола [431;432]. Карвакрол је показао инхибиторни ефекат против сојева *Escherichia coli* O157:H7 и *Listeria monocytogenes* [433]. Резултати испитивања антимикуробног деловања етарског уља *S. cuneifolia* и чистих супстанци карвакрола, тимола и *p*-цимена, на пет сојева патогених бактерија (*B. cereus* и *E. coli* *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *S. lutea*) су показали да је активност карвакрола у нивоу деловања етарског уља, мада је карвакол деловао у већој концентрацији у односу на уље , али боље у односу на тимол и *p-cimen*[341].

У *in vitro* испитивању 25 бактерија, експериментално је доказана знатно боља активност етарских уља тимијана и оригана у односу на карвакрол и тимол [20]. Осим на сој *Leuconostoc cremoris*, на остала 24 бактеријска соја карвакрол је дао слабије зоне инхибиције (14,1-45,3 mm) у односу на оне за етарска уља *Thymus vulgaris* (23,4- >90mm) и *Origanum vulgare* (9,4- >90 mm) [20]. Активност карвакрола и тимола је поређена са активношћу етарских уља *S. spinosa*, *S. thymbra*, *S. parnassica* ссп. *parnassica*. *Thymus longicaulis*, *Origanum vulgare* ссп. *hirtum* и *Origanum dictamnus* на пет патогених бактеријских сојева. Карвакрол (дијаметар зона инхибиције од 7,08-8,01 mm) и тимол (дијаметар зона инхибиције од 9,34-11,75 mm) су показали лошију активност у односу на сва тестирана уља која су богата овим фенолним једињењима: карвакрол од 1,39-88,71% и тимол од 3,53-43,48% (са изузетком врста рода *Origanum* са незнатним садржајем тимола). Ови подаци иду у прилог како добром антимикуробном деловању доминантних компоненти карвакрола и тимола, тако и њиховом синергистичком деловању са осталим компонентама уља, због чега су она испољила знатно бољу активност (дијаметар зона инхибиције од 10,82-56,29 mm) [434].

Тестирањем тимола на сојеве *S. typhimurium* и *S. aureus*, на основу резултата, као и претходних радова, закључили су да тимол формира везу са хидрофобним деловима мембранских протеина мењајући пермеабилност мембране, као и да је ефикаснији при рН 5,5 него на рН 6,5. [296] Ово је веома важно ако узмемо у обзир да се хитозанске честице распадају при нижим рН вредностима, рН око 4-5, како би се честице дезинтегрисале и отпустиле активну супстанцу која ће бити стабилна и испољити максимално антибактеријско дејство у киселој средини вагиналне флоре. Механизам антибактеријског дејства тимола се заснива највероватније на дисоцијацији молекула тимола тако да они постају хидрофобнији, боље се растварају у липидној компоненти мембране и лакше успостављају везу са хидрофобним крајевима мембранских протеина [296].

Као доказ о значају хидроксилних група у монотерпенским јединицама иде у прилог студија која је показала да биохемијски прекурсори карвакрола и тимола,

монотерпенски угљоводоници, γ -терпинен и *p-cimen* (слика 4.5) не показују антимикуробну активност због непостојања слободне хидроксилне групе у њиховом скелету [249]. На исти начин се објашњава и неактивност метил етра карвакрола и карвакрол-ацетата [430]. Међутим, биолошки прекурсор карвакрола п-цимен је хидрофобан и изазива бубрење цитоплазматске мембране више од карвакрола. Када се комбинује са карвакролом *in vitro* постоји синергизам – *p-cimen* се инкорпорира у цитоплазматску мембрану и доводи до већег транспорта карвакрола кроз мембрану [277].

Линалол је монотерпенски алкохол који је највише заступљен у тимијану, па оригану и жалфији, показује слабију антимикуробну активност у односу на карвакрол, тимол и еугенол, али је такође добар антимикуробни агенс и синергистички са осталим оксидованим монотерпенима даје одличне антимикуробне ефекте [249].

Борнеол, оксидовани монотерпен који је карактеристичан за жалфију је такође испољио и извесну антимикуробну активност на 9 од 25 тестираних бактеријских сојева [20].

Поред фенолних монотерпена, значајно анибактеријско дејство имају алкохоли, алдехиди и кетони.

Алкохоли поседују бактерицидну активност, пре него бактериостатску. Њихов механизам дејства се заснива на денатурацији, њиховим растварачким и дехидратационим својствима [419]. Алдехиди представљају снажна антимикуробна средства и њихов механизам дејства се заснива на процесу коњугације и стварању двоструких веза алдехидне групе и угљеника мембранских протеина, чиме се повећава електронегативност и антибактеријско дејство самог једињена [435]. Ова електронегативна једињена ће реметити биолошке процесе који укључују трансфер електрона у бактеријској ћелији и реакције са азотним компонентама, какви су протеини и нуклеинске киселине, што условљава инхибицију раста бактеријске ћелије [435]. Кетони су такође снажна антимикуробна средства [20].

Стерохемија такође има утицаја на антибактеријску активност. Доказано је да су α изомери мање активни од β изомера, (α пинен), док су неки цис изомери неактивни у односу на транс (оксидовани монотерпени гераниол и нерол) [14]. Све ово је у складу са доказано већом активношћу тимијана који једини, поред жалфије од испитиваних етарских уља садржи гераниол. Жалфија садржи знатно мање гераниола и нерола, као што се је и њена антимикуробна активност показала знатно нижа у односу на тимијан.

Експериментално је потврђено и да многи сесквитерпенски угљоводоници (α -humulen, cariofilen oxid, α -сораен, cariofilen, bornil acetat) имају извесну активност [20], што је случај и са доминантним компонентама у етарском уљу. тимијана и оригана. Овако висока антимикуробна активност ових уља се може објаснити пре свега синергистичким деловањем њихових многобројних компоненти.

У разумевању антимикуробног дејства етарских уља веома је значајан експериментални доказ о интензитету антибактеријског дејства различитих хемијских компонената етарских уља, на 25 бактеријских сојева [20]. Установљено је да компоненте етарских уља делују антибактеријски следећим интензитетом: timol > karvakrol > α -terpineol > terpinen-4-ol > eugenol > linalol > tujon > Δ 3-karen > cis-hex-3-an-1-ol > geranilacetat > (cis_trans) citral > nerol > geraniol > menton > β -pinen > R (-)-limonen > α -pinen > α -terpinen > borneol > (-)-sabinen > γ -terpinen > citronelal-

terpinolen > 1,8-cineol > bornil-acetat > karvakrol-metil-etar > mircen > β -kariofilen > α -bisabolol > α -felandren > α -humulen > β -ocimen > aromadendren > *p*-cimen. [20]

8.2. Одређивање степена инкапсулације и кинетике отпуштања тимијана из микрочестица

Према већ описаним методама у делу 7.3. формулисане су хитозанске честице са инкапсулираним етарским уљем тимијана, а затим одређена зависност степена инкапсулације у односу на варијабиле које су нашем случају биле концентрација етарског уља тимијана и концентрација глутаралдехида.

Израчуната је зависност количине инкапсулираног полифенола од почетне концентрације полифенола, што је приказано табеларно и графички, табела 7.9. и слика 7.17. Из прорачуна се види да се да повећањем почетне концентрације тимијана повећава и степен инкапсулације биоактивне компоненте у хитозанске микрочестице. У табели 7.12. дата је вредност степена инкапсулације, за хитозанске микрочестица у којима је варирана концентрација глутаралдехида, а затим израчунати степени инкапсулације. На основу добијених резултата, који су приближне вредности, закључујемо да концентрација глутаралдехида не утиче на степен инкапсулације.

Кинетика отпуштања полифенола из микрочестица у околни медијум праћена је преко промене концентрације укупних полифенола у току времена FC метода, која је описана у одељку 6.3.4.1. а затим су добијени резултати приказани табеларно и графички у одељку 7.5.

Са слике 7.18. се види да се са повећавањем почетне концентрације тимијана, повећава и степен инкапсулације полифенола у хитозанске микрочестице.

У табели 7.14. приказани су експериментални резултати добијени мерењем апсорбанци узорка из испирка у одређеним временским интервалима и израчунат је проценат отпуштеног тимијана, за различите концентрације глутаралдехида, у различитим временским интервалима од почетка испуштања. Концентрације су прерачунате како је описано у одељку 6.3.6. Варирањем концентрације глутаралдехида праћен је проценат отпуштања тимијана из микрочестица у различитим временским интервалима, слика 7.19. Са слике 7.19. се види да концентрација глутаралдехида не утиче на проценат отпуштања тимијана.

8.3. Карактеризација микрочестица

Величина хитозанских микрочестица је испитивана помоћу електронског микроскопа. Узорци добијених хитозанских честица са 1,2% и 1,5 % етарског уља тимијана и варираним концентрацијама глутаралдехида – GA (2%, 3%, 5%, 8%), су снимани, и мерене су величине пречника појединачних честица у узорку. Добијени резултати су приказани у табели 7.15., док су микроскопски снимци приказани на сликама 7.20-7.23. Средња величина овако припремљених микрочестица варира у зависности од концентрације етарског уља и глутаралдехида од 4,71 μ - . 13,64 μ m.

ANOVA тестом утврђено је да нема значајне разлике у величини честица за GA 2 и 3 % као ни у величини честица за GA 5 и 8%. Значајне разлике у величини честица (на нивоу 0.01) су за GA 2% у односу на 5% и 8%, односно у величини честица за GA 3% у односу на 5% и 8%

На основу резултата можемо закључити да се пречници микрочестица, односно величина микрочестица повећава са повећањем концентрације тимијана, а смањује са повећањем концентрације глутералдехида.

8.4. Антимикробно дејство етарских уља

In vitro антимикробно дејства етарских уља, као и антимикробних супстанци за третирање бактеријских вагиноза (клиндамицин и нистатин) су квалитативно и квантитативно испитани одређивањем ширине зоне инхибиције, као и одређивањем MIC вредности за свако уље, објашњење у одељку 6.2.1. Узевши у обзир чињеницу да формулишемо вагиналне препарате за третирање бактеријских вагиноза, испитали смо и потенцијално синергистичко дејство етарских уља и сублеталне дозе млечне киселине. Резултати су изражени ширином зоне инхибиције и приказани у табели 7.16, као и на сликама 7.24. – 7.26.

Одређивањем величина зона инхибиције стандардних антибиотика, уочено је знатно јаче антимикотичко дејство нистатина (30µl/ml) у односу на испитивана етарска уља (20µl/ml). Међутим, етарска уља фамилије *Lamiaceae* (оригано, тимијан, жалфија), су показала знатно јаче антимикробно дејство од стандардних дискова клиндамицина (30µl/ml).

Обзиром да се наш рад бави испитивањем антимикробног дејства одабраних етарских уља (еукалиптус, ким, коријандер, морач, орегано, жалфија, тимијан) на изазиваче бактеријске вагинозе, неопходно је било испитати и њихово антибактеријско дејство на лактобациле, који су присутни у вагиналној флори жене и неопходни за одржавање нормалне бактеријске вагиналне флоре, табела 7.17.

Према резултатима приказаним у табели 7.17. уочава се висока осетљивост лактобацила на тестирана етарска уља, посебно оригана и тимијана. Зоне инхибиције за оригано и тимијан су шире код ових сојева у односу на патогене сојеве *S. aureus* и *E. coli*. Међутим, *Lactobacillus acidophilus*, за разлику од осталих *Lactobacillus* врста, показује слабију осетљивост на ова уља, јер су уочене зоне дифузне, што значи да бактерија расте у мањем броју. Могло би се рећи да етарска уља оригана и тимијана делују бактериостатски (смањују раст), а не бактерицидно (не дозвољавају раст) соја *Lactobacillus acidophilus*. Смањена осетљивост *L. acidophilus* на етарско уље менте и *Ziziphora clinopodioides* је и експериментално доказано [436].

Смањену осетљивост *L. acidophilus* ATCC 4356 на етарска уља рузмарина, тимијана и оригана, у односу на тестиране патогене сојеве Грам негативних бактерија *E. coli* и *Salmonella sp.* су уочили Rolan и сар. [437]. Оууханд и сар. су уочили већу осетљивост потенцијалних патогених бактерија (*Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica*, *Streptococcus epidermis* и *E. coli*) на етарска уља оригана, тимијана и рузмарина као и неких чистих фракција ових уља, у односу на интестиналне бактерије *Lactobacillus sp.* и *Bifidobacterium sp.*

Генерално се може рећи да, антимикробни ефекат етарских уља на корисне бактерије *Lactobacillus* врста, зависи од примењеног соја за тестирање, али да се може уочити у појединим случајевима повећана резистентност ових бактерија.

Резултати наших истраживања потврђују ове налазе, посебно код соја *L. acidophilus*, који је често присутан као бројнија врста вагиналне микрофлоре, а који је у нашим истраживањима показао смањени раст уз преживљавање у присуству етарских уља оригана и тимијана. Сви резултати, како наших тако и већ доказаних испитивања, дају позитиван став за употребу ових етарских уља као антибактеријских агенаса за вагиналну примену. Чињеница да етарска уља тимијана и оригана делују бактериостатски на лактобациле, као и појава резистенције лактобацила на деловање етарског уља тимијана, показје да се употребом оваквих препарата, неће нарушити нормална вагинална флора. Ово значи да ће, лактобацили наставити да егзистирају након употребе етарског уља тимијана у одређеној формулацији као антимикробног агенса, што је веома важно са аспекта очувања нормалне вагиналне микрофлоре.

Одређивање антимикробне активности етарских уља која је приказана на сликама 7.24-7.26., представљало је одлучујући фактор који ће одредити које ћемо уље издвојити као најактивније и инкорпорирати у хитозанску честицу, и која ће као таква имати значајну антимикробну активност. На сликама 7.27 и 7.28. је представљено антимикробно дејство хитозанских честица са различитим концентрацијама етарског уља, као и самог хитозана. Можемо видети да је антимикробна активност хитозанских честица зависна од концентрације етарског уља тимијана у њима, иако се види да и сам хитозан има антимикробно дејство, о чему говоре и бројна истраживања [446, 447, 448, 449].

Применом диск дифузионе методе, сва испитана етарска уља, осим морача, су показала антимикробну активност против тестираних микроорганизама, чија се јачина огледа у ширини зоне инхибиције. Међу Грам-позитивним бактеријама, већу осетљивост је показала *S. aureus* (0,1-12mm) у односу на *E. faecalis* (2-8 mm), који је неосетљив на деловање етарских уља кима, коријандера и морача. Нешто слабију осетљивост је показала Грам-негативна бактерија *E. coli* ATCC 25922 (1-8 mm) која је такође неосетљива на дејство коријандера и морача. Ниска осетљивост грам-негативних бактерија на етарска уља може бити последица грађе њиховог ћелијског зида који поседује додатну спољашњу мембрану око пептидогликанског слоја [310], што смањује дифузију хидрофобних компоненти кроз њихов липополисахаридни омотач [445]. Поред тога, вршено је и испитивање комбинације етарских уља и млечне киселина, која и сама има антимикробно дејство, а због своје рН вредности била би погодна да синергистички антибактеријски делују на испитиване бактерије. Овакав синергизам би се могао искористити у даљим испитивањима одабраних етарских уља и млечне киселине као потенцијалних антимикробних агенаса у вагиналним препаратима, као што је већ напоменуто раније. На основу резултата мерења зона инхибиције, види се повећана антимикробна активност етарског уља, у првом реду тимијана, у комбинацији са млечном киселином, и то посебно када је у питању антимикотичко деловање на *C.albicans*, што би могло бити тема неких будућих формулација и испитивања.

Сва тестирана етарска уља, осим етарских уља коријандера и морача, показују антимикотичку активност према *C.albicans*.

Испитана етарска уља су показала различите јачине антибактеријског деловања, а опадајући редослед је следећи: тимијан > оригано > жалфија >

еукалиптус > ким > коријандер > морач. На основу ових вредности определили смо се да за даљу анализу изаберемо прва четири етарска уља која имају најјаче антибактеријско дејство, а о чијој антибактеријској активности постоје и бројни литерарни подаци који то потврђују [14, 16, 20, 22, 25, 26, 206, 225, 229, 230, 231, 232, 26, 237, 239, 244, 254, 277, 290, 296, 329, 411, 429, 434].

Прелиминарна испитивања антимикуробног дејства етарских уља су показала да етарска уља биљака фамилије *Apiacea* (ким, морач, коријандер) имају знатно слабије антибактеријско дејство од етарских уља биљака фамилије *Lamiacea*, што је и у складу са литературним подацима [14, 20, 225, 277]. Зато смо даља испитивања усмерили ка етарским уљима биљака фамилије *Lamiacea* - жалфији, оригану, тимијану, као и еукалиптусу (*Myrtaceae*), како би смо одабрали етарско уље са најоптималнијим антимикуробним дејством које би се могло имплементирати у одговарајући хитозански *Drug Delivery system*.

Наредна фаза утврђивања антимикуробне активности је обухватала одређивање МИС и МВС етарских уља еукалиптуса, жалфије, оригана и тимијана на одабране бактерије. Праћена је и кинетика антимикуробног дејства ових уља у току 24 h. и резултати су приказани на сликама 7.29 – 7.37.

Етарско уље оригана и тимијана у концентрацијама од 5 $\mu\text{l/ml}$ и 3 $\mu\text{l/ml}$ делују бактериостатски. Резултати приказани на слици 6.30. показују да етарска уља жалфије и еукалиптуса показују значајнију антимикуробну активност према *E. coli* у концентрацијама већим од 50 $\mu\text{l/ml}$. Потпуну инхибицију раста, остварују у концентрацији од 100 $\mu\text{l/ml}$, која би се могла сматрати и њиховом МИС вредношћу. Нешто јаче инхибиторно дејство показује етарско уље жалфије у односу на етарско уље еукалиптуса.

На слици 7.30. се може уочити да је *E. coli* осетљивија на дејство етарских уља оригана и тимијана у односу на етарска уља жалфије и еукалиптуса. Значајна инхибиција раста се уочава при концентрацијама од 5 $\mu\text{l/ml}$, која се може сматрати МИС вредношћу. Нема значајније међусобне разлике у антимикуробном деловању ова два уља на *E. coli*.

Етарска уља жалфије и еукалиптуса релативно слабо инхибирају раст *E. faecalis* при ниским концентрацијама (10 $\mu\text{l/ml}$ и 30 $\mu\text{l/ml}$), слика 6.32. Значајније смањење броја ћелија *E. faecalis* се уочава тек при концентрацијама етарских уља жалфије и еукалиптуса од 50 $\mu\text{l/ml}$, а концентрација од 100 $\mu\text{l/ml}$ није довољна за потпуну инхибицију раста ове бактерије. Нешто бољу антимикуробну активност према *E. faecalis* показује етарско уље еукалиптуса у односу на етарско уље жалфије, вероватно због садржаја монотерпенског угљоводоника *p-cimena* (22.25%) у еукалиптусу [435].

Антимикуробни ефекат етарских уља оригана и тимијана при испитиваним концентрацијама од 1, 3, 5 и 10 $\mu\text{l/ml}$ је довољан за ефикасну инхибицију раста *E. faecalis*, и МИС износи 1 $\mu\text{l/ml}$ (слика 7.32.). Нешто јачи ефекат показује етарско уље тимијана у односу на етарско уље оригана.

Са слике 7.33. се може уочити знатна инхибиција раста *S. aureus* дејством етарских уља жалфије и еукалиптуса у концентрацијама већим од 30 $\mu\text{l/ml}$. МИС вредности ових уља за *S. aureus* износе 50 $\mu\text{l/ml}$ за етарско уље жалфије и 100 $\mu\text{l/ml}$ за етарско уље еукалиптуса.

Значајно антимикубно деловање етарских уља оригана и тимијана према *S. aureus* се може уочити из резултата приказаних на слици 7.34. МИС вредности за тимијан и оригано у овом случају износе 3 $\mu\text{l/ml}$.

C. albicans показује мању осетљивост на деловање етарског уља еукалиптуса које при употребљеним концентрацијама не доводи до потпуне инхибиције раста ове условно патогене гљивице, слика 7.35. Нешто јаче антимикубно дејство у примењеним концентрацијама показује етарско уље жалфије. МИС вредност етарског уља жалфије за *C. albicans* је нешто виша од 100 $\mu\text{l/ml}$.

Етарско уље тимијана и оригана показују слабије антимикубно дејство према условно патогеној гљивици *C. albicans* у примењеним концентрацијама, слика 7.36. Нешто бољи ефекат показује уље тимијана које смањује раст ћелија *C. albicans* за 50% у концентрацији од 10 $\mu\text{l/ml}$ (МИС₅₀ вредност).

Сумирајући приказане резултате може се рећи да су резултати ових испитивања у сагласности са резултатима прелиминарних испитивања антимикубног дејства етарских уља применом дифузије у бунарчићима.

Уочено је да етарско уље жалфије, при нижим концентрацијама, делује углавном бактериостатски на испитане микроорганизме. У концентрацији од 100 $\mu\text{l/ml}$ у потпуности зауставља раст *E. coli* и *S. aureus* (МИС вредност од 100 $\mu\text{l/ml}$). *E. faecalis* и *C. albicans* показују већу резистентност на примењене концентрације овог етарског уља. Мањи антимикубни ефекат, у односу на жалфију, показује етарско уље еукалиптуса. У концентрацији од 100 $\mu\text{l/ml}$, значајнији инхибиторни ефекат ово уље показује само на Грам позитивну бактерију *S. aureus*, док остали сојеви преживљавају у већем степену.

Етарска уља оригана и тимијана у концентрацијама од 5 $\mu\text{l/ml}$ и 3 $\mu\text{l/ml}$ делују бактерицидно на *E. coli* и *S. aureus*, респективно. Бактериостатично дејство ова два уља при примењеним концентрацијама се уочава према *E. faecalis* и *C. albicans*. Овакви резултати су делом очекивани, с обзиром на прелиминарне резултате зона инхибиције коришћених микроорганизама.

Према многим литературним подацима, као што је и раније напоменуто, компоненте етарских уља које углавном доприносе њиховом антимикубном ефекту су тимол и карвакрол. Етарско уље еукалиптуса које је коришћено у овом раду, не садржи ни једну од ових компонента. Највећи удео у овом етарском уљу имају лимонен (30,96%) и α -пинен (12,21%) који показују умерену антимикубну активност [20].

Тимол се у већој концентрацији налази у етарском уљу тимијана (36.12%), а знатно мање у етарском уљу оригана (5.69%) и жалфије (1.91%). Карвакрол се у већем проценту налази у етарском уљу оригана (59.03%), а знатно мање у етарском уљу жалфије (3.32%) и етарском уљу тимијана (2.34%). Поред одређених концентрација ових супстанци у датом етарском уљу, у многим радовима је установљено да антимикубна активност етарског уља зависи и од међусобног односа ове две компоненте као и од садржаја осталих компонента у етарском уљу. У своме раду Pirbalouti и сар. су установили различит степен МИС вредности етарског уља тимијана, према *E. coli* и *S. aureus*, у зависности од међусобног односа тимола и карвакрола [440]. Највиша МИС вредност од 312 $\mu\text{g/ml}$ за *S. aureus* је установљена у етарском уљу тимијана са односом тимијан/карвакрол од 21,66/7,45, али и код етарског уља са односом 25.94/23.54 за које је установљен МИК од 39 $\mu\text{g/ml}$. Остале врсте уља тимијана су показала МИС вредности испод 19 $\mu\text{g/ml}$.

Највишу вредност МИС од 39 $\mu\text{g/ml}$ за *E. coli* је показало етарско уље тимијана код кога је установљен однос тимијан/карвакрол од 24,86/7,6. Остале врсте уља тимијана су имале МИС вредност испод 19 $\mu\text{g/ml}$.

Према раду Cleff и сар. антифунгална активност уља оригана такође је у функцији односа тимола и карвакрола [441]. Најјаче антифунгално дејство, према *C. albican*, са МИС вредностима око 3,5 $\mu\text{g/ml}$ су показала етарска уља оригана са односом тимол/карвакрол од 10,2/12,67 и 8,4/9,44. Најслабију антифунгалну активност, са МИС вредношћу од око 8 $\mu\text{g/ml}$ је показало етарско уље оригана са већинским уделом карвакрола (однос 0,56/21,58).

Поредећи резултате из овог рада са наведеним литературним подацима, може се рећи да је однос тимол/карвакрол код етарских уља тимијана, оригана и жалфије износи 36,12/2,34; 5,69/59,03 и 1,91/3,32, респективно. Овакав однос тимола и карвакрола може објаснити изузетну антимикуробну активност етарских уља тимијана и оригана према *E. coli* и *S. aureus* и знатно слабију активност према *C. albicans* и *E. faecalis* као и бољу активност етарског уља жалфије на *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* у односу на етарско уље еукалиптуса.

Иако је, према добијеним резултатима, антимикуробно дејство етарског уља тимијана према *C. albicans* мање од очекиваног, могу се узети у обзир и други позитивни ефекти овог етарског уља или његових компоненти. Наиме, у свом раду, Braga је показао да тимол у сублеталним концентрацијама (до 1/8 МИС вредности) успешно смањује адхезивност бактерија *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* на хумане вагиналне епителне ћелије [442]. Адхезија микроорганизама за епител је неопходан услов за развој њихове патогенезе. У наведеном истраживању, Braga наводи да је тимол утицао на поремећај ћелијског зида бактерија и квасца и тиме умањио њихову способност адхезије [442].

У раду Adamsa и сар се наводи да етарско уље оригана успешније инхибира патогене квасце врста *C. albidus*, *C. neoformans* и *R. rubrum* у односу на *C. albicans* [443]. Овде се тимол, као састојак етарског уља оригана такође наводи као главни носилац антифунгалног дејства које се огледа у стварању деформитета омотача ћелије квасца, и утицаја на експоненцијалну фазу раста при чему индукује пуцање ћелија које нису у деоби и тиме спречава процес пупљења.

У раду Eftekhara и сар., тимол и карвакрол су показали средњу антимикуробну активност према *E. faecalis* са вредностима МИС од 0,8 mg/ml . Резултати овог рада указују такође на слабију антимикуробну активност етарских уља тимијана и оригана, који садрже ове две компоненте, на *E. faecalis* [444].

Сходно добијеним резултатима и потенцијалним могућим дејствима на основу литературних података, етарско уље тимијана је показало најјаче антибактеријско дејство на испитане бактерије. С обзиром на његово природно порекло и бројна биохемијска и фармаколошка истраживања, вероватноћа да ће се ово етарско уље показати токсичним у фармаколошким тестовима је врло мала, што би било од изузетног значаја за његову потенцијалну примену у лечењу гениталних инфекција, нарочито код жена са хроничним вулво-вагиналним бактеријским и гљивичним инфекцијама.

9. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације извршена су хемијска и микробиолошка испитивања 7 различитих етарских уља, фамилија *Lamiaceae* (жалфија, оригано, тимијан) и *Apiaceae* (ким, морач, коријандер), као и етарског уља еукалиптуса (*Myrtaceae*). Поред тога извршена је формулација хитозанских честица са етарским уљем тимијана и праћена кинетика отпуштања инкапсулираног етарског уља из израђених честица.

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

1. Хемијском анализом етарских уља применом гасне хроматографије са масеном спектрометријом (GC-MS) установљено је да тестирана етарска уља превасходно садрже терпене, међу којима убедљиво доминирају монотерпенска једињења у односу на сесквитерпене. Доказано је пристство 107 различитих терпенских компонената: 17 монотерпенских угљоводоника, 5 ароматичних монотерпена, 41 оксидовани монотерпен, 2 фенилпропаноида, 3 сесквитерпенска угљоводоника, 12 моноцикличних сесквитерпена, 2 бициклична и 1 трициклични сесквитерпен.

2. Састав етарских уља се значајно квалитативно и квантитативно разликује што се објашњава чињеницом да је у оквиру тезе анализирано 7 различитих етарских уља, које припадају различитим фамилијама. Међутим, појединачне компоненте се значјно истичу у оквиру сваке врсте етарског уља па тако можемо закључити које су компоненте карактеристичне за одређену врсту.

- За етарско уље еукалиптуса може се уочити доминација компонената као што су: оксидовани монотерпен еукалиптол (20,66%), угљоводонични монотерпени лимонен (30,96%) и α -*pinen* (12,21%) и ароматични монотерпен, *p-cimen* (22,25%).
- У етарском уљу кима доминирају монотерпени (94,08%), и то најдоминантнији су: ароматични монотерпен *p-cimen* (25,60%), затим угљоводонични монотерпени α -*pinen* (13,25%), лимонен (29,85%) и угљоводонични монотерпен еукалиптол (16,98 %).
- У етарском уљу коријандера доминирају монотерпени, и то ароматични монотерпени *p-cimen* (23,12%), оксидовани монотерпени еукалиптол (19,64%) и монотерпенски угљоводоници лимонен (31,10%) и α -*pinen* (11,96%).
- У етарском уљу морача доминира, ароматични монотерпен, фенилпропанског типа, транс-анетол (63,16%), и заузима више од половине уља. Остале доминантне компоненте су оксидовани монотерпен естрагол (6,43%) и монотерпенски угљоводоници L-fenchon (15,53%), лимонене (4,69%) и α -*pinen* (4,33%). Сесквитерпена има готово у траговима.
- У етарском уљу оригана више од половине укупног уља чини доминантно једињење- оксидовани монотерпен карвакрол (59,03%); знатно мање тимол

(5,69%), а затим монотерпенски угљоводоници *p-cimen* (5,02%) и *γ-terpinen* (4,64 %).

- У етарском уља жалфије доминира оксидовани монотерпен *α-tujon* (29.9%), затим камфор (15.47%) и *β-tujon* (13.68%), карвакрол (3.32), затим монотерпенски угљоводоници камфен (3.04%) и *α-pinene* (2.63%) ,а значајан је и садржај сесквитерпенског угљоводоника 1-*α*-борнил ацетата (2.23%).
- У етарском уљу тимијана више од половине укупног уља чини 6 доминантних једињена, где доминира оксидовани монотерпен тимол (36,12%), а затим монотерпенски угљоводоник *p-cimen* (21,15%). Остале доминантне компоненте овог етарског уља су *γ-terpinen* (6.98%), линалол (5,90%), карвакрол (4,54 %) и еукалиптол (4,74%).

3. Сва испитивана етарска уља, осим етарског уља морача, су показала антибактеријску активност у агар диск дифузионом тесту против тестираних микроорганизама. Пет од седам тестирани етарских уља, осим уља коријандера и морача, показују антимицотичку активност према *C.albicans*. Индикаторски сојеви су такође показали осетљивост на антимицробне агенсе , клиндамицин и нистатин, али знатно мању од осетљивости на етарска уља тимијана, жалфије и оригана.

Испитана етарска су показала различите јачине антибактеријског деловања, а опадајући редослед је следећи: *џимијан* > *оријано* > *жалфија* > *еукалиптус* > *ким* > *коријандер* > *морач*.

4. Уочено је синергистичко дејство етарских уља и млечне киселине ,одређивањем антимицробне активности комбинације етарских уља и млечне киселине. Мерењем и упоређивањем зона инхибиције, види се повећана антимицробна активност етарског уља, у првом реду тимијана, у комбинацији са млечном киселином, и то посебно када је у питању антимицотичко деловање на *C.albicans* , што би могло бити тема неких будућих формулација и испитивања. Ово је веома значајно ако узмемо у обзир чињеницу да млечна киселина може послужити као алтернативно средство у регулисању киселе рН вредности вагине, као и да се препарати са млечном киселином препоручују како за лечење, тако и за профилаксу бактеријске вагинозе.

5. Сва испитана етарска уља, осим тимијана, имају бакетриостатско дејство према тестираним патогеним микроорганизмима. Етарско уље тимијана има бактерицидно дејство према референтном соју *S.aureus* који је коришћен у раду. Од Грам-позитивних бактерија, већу осетљивост је показала *S. aureus* (0,1-12mm) у односу на *E. faecalis* (2-8 mm), који је неосетљив на деловање етарских уља кима, коријандера и морача. Нешто слабију осетљивост је показала Грам-негативна бактерија *E. coli* (1-8 mm) која је такође неосетљива на дејство коријандера и морача. Сва тестирана етарска уља, осим етарских уља коријандера и морача, показују антимицотичку активност према *C.albicans*

6. *Lactobacillus* врсте показују значајну осетљивост према антимицробном дејству испитаних етарских уља, посебно уља тимијана и оригана. Међутим, *Lactobacillus acidophilus*, за разлику од осталих *Lactobacillus* врста, показује слабију осетљивост на ова етарска уља, јер су уочене зоне дифузне, што значи да бактерија расте у мањем броју. На основу овога би се могло закључити да етарска уља оригана и тимијана делују бактериостатски (смањују раст), а не бактерицидно (не дозвољавају раст) на *Lactobacillus acidophilus* који је доминантан у нормалној

вагиналној флори, што нам даје позитиван став за употребу ових етарских уља као антибактеријских агенаса за вагиналну примену.

7. Хитозанске честице са инкапсулираним етарским уљем тимијана, као и сам хитозан, показују значајну антимикробну активност на све испитане сојеве микроорганизама. Антимикробна активност хитозанских честица сразмерна је концентрацији етарског уља тимијана у њима.

8. Дефинисањем минималних инхибиторних концентрација (MIC) бујон дилуционом методом испитиваних уља на тестирану *E.coli* утврђено је:

MIC вредност за етарска уља жалфије и еукалиптуса је 100 $\mu\text{l/ml}$ (показују антимикробну активност при концентрацијама већим од 50 $\mu\text{l/ml}$, али потпуну инхибицију раста при концентрацији од 100 $\mu\text{l/ml}$). Примећује се већа антимикробна активност жалфије у односу на еукалиптус.

MIC вредност за етарска уља оригана и тимијана је 5 $\mu\text{l/ml}$. Нема значајније међусобне разлике у антимикробном деловању ова два уља на *E. coli*.

9. Дефинисањем минималних инхибиторних концентрација (MIC) бујон дилуционом методом испитиваних уља на тестирану *S.aureus* утврђено је:

MIC вредности етарских уља жалфије и еукалиптуса износе 50 $\mu\text{l/ml}$ за етарско уље жалфије и 100 $\mu\text{l/ml}$ за етарско уље еукалиптуса, при чему се може уочити знатна инхибиција раста *S. aureus* овим етарским уљима у концентрацијама већим од 30 $\mu\text{l/ml}$.

MIC вредности за тимијан и оригано износе 3 $\mu\text{l/ml}$.

10. Дефинисањем минималних инхибиторних концентрација (MIC) бујон дилуционом методом испитиваних уља на тестирану *E.faecalis* утврђено је:

Смањење броја ћелија *E. faecalis* се уочава тек при концентрацијама етарских уља жалфије и еукалиптуса од 50 $\mu\text{l/ml}$, а концентрација од 100 $\mu\text{l/ml}$ није довољна за потпуну инхибицију раста ове бактерије.

MIC вредности за тимијан и оригано износе 1 $\mu\text{l/ml}$.

11. Дефинисањем минималних инхибиторних концентрација (MIC) бујон дилуционом методом испитиваних уља на тестирану *C.albicans* утврђено је:

MIC вредност етарског уља жалфије за *C.albican* је нешто виша од 100 $\mu\text{l/ml}$. *C.albicans* показује мању осетљивост на деловање етарског уља еукалиптуса које при коришћеним концентрацијама не доводи до потпуне инхибиције раста ове патогене гљивице.

Етарско уље тимијана и оригана показују слабије антимикробно дејство према патогеној гљивици *C.albicans* у примењеним концентрацијама. Нешто бољи ефекат показује уље тимијана које смањује раст ћелија *C.albicans* за 50% у концентрацији од 10 $\mu\text{l/ml}$ (MIC₅₀ вредност).

12. Израчунавањем степена инкапсулације етарског уља тимијана, варирањем концентрације етарског уља тимијана, као и концентрације глутаралдехида, као умреживача непоходног за стварање честица *cross-linking* методом, закључујемо:

- повећањем почетне концентрације тимијана повећава и степен инкапсулације биоактивне компоненте у хитозанске микрочестице
- концентрација глутаралдехида не утиче на степен инкапсулације

13. Праћењем кинетике отпуштања полифенола из микрочестица у околни медијум преко промене концентрације укупних полифенола у току времена (ФС методом), и прерачунавањем параметара, установљено је да концентрација глутералдехида не утиче на проценат отпуштања тимијана.

14. Одређивањем величине хитозанских микрочестица помоћу електронског микроскопа утврђено је да је средња вредност величине честица зависна од почетне концентрације инкорпорираног етарског уља тимијана. То значи да је величина хитозанских честица са етарским уљем тимијана директно пропорционална концентрацији уља тимијана, односно да се пречници микрочестица повећавају са повећањем концентрације тимијана.

15. Варирањем концентрације глутералдехида (2%, 3%, 5%, 8%) и одређивањем величине честица електронским микроскопом утврђено је да нема статистички значајне разлике у величини честица за GA 2 и 3 % као ни у величини честица за GA 5 и 8%. На основу овога можемо закључити да се величина хитозанских честица смањује са повећањем концентрације глутералдехида.

Резултати испитивања ове докторске дисертације јасно указују на значајну антимикуробну активност етарског уља тимијана и његове инкпсулације у најсавременије фармацеутске облике, тзв *Drug delivery* системе, који би контролисаним отпуштањем активне супстанце омогућили стално присуство антимикуробног агенса у току антимикуробне терапије. Активност хитозанских честица у киселој средини, широк антибактеријски спектар тимијана, као и бактериостатско дејство истог на лактобациле, указују на могућност израде и употребе вагиналних антимикуробних фитопрепарата у терапијске и профилактичке сврхе. Ови биолошки активни природни производи би били идеална замена за конвенционалне препарате, посебно ако узмемо у обзир све чешћу појаву резистенције на примењене антибиотике која постаје глобалан проблем. Модификације у структури самог хитозана, увођењем тиолних група како би се повећала мукоадхезивност самих честица, би могли бити предмет будућих истраживања у формулисању идеалног вагиналног антибактеријског фитопрепарата.

10. ЛИТЕРАТУРА

1. Tuner K, Nord CE. Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria in Europe. *Clin Infect Dis* 1993; 16 (4): 382-386.
2. Hillier S, Krohn L, Rabe L, Klebanoff S, Eschenbach D. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin. Infect. Dis* 1993; 16 (4): 273-281.
3. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology* 2004; 150: 2565–2573.
4. Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 375–379.
5. Reid G, Burton J. Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 2004; 4: 319–324.
6. Majeroni BA . Bacterial vaginosis: An update. *Am Fam Phys* 1998; 57: 1285-92.
7. Hillier SL, Kiviat NB, Hawes SE, Hasselquist MB, Wolner Hansen P, Eschenbach DA. Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 435-41.
8. Dickey LJ, Nailor MD, Sobel JD. Guidelines for the treatment of bacterial vaginosis: Focus on tinidazole. *Ther Clin Risk Manag* 2009; 5: 485–489.
9. Beigi RH, Austin MN, Meyn LA, Krohn MA, Hillier SL. Antimicrobial resistance associated with the treatment of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1124-1129.
10. Nyirjesy P, McIntosh MJ, Gattermeir DJ, Schumacher RJ, Steinmetz JI, Joffrion JL.(2006). The effects of intravaginal clindamycin and metronidazole therapy on vaginal lactobacilli in patients with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 1277–1282.
11. Goldstein EJ, Citron DM, Cherubin CE, Hillier SL. Comparative susceptibility of the Bacteroides fragilis group species and other anaerobic bacteria to meropenem, imipenem, piperacillin, cefoxitin, ampicillin/sulbactam, clindamycin and metronidazole. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31 (3): 363-372.
12. Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. In vitro activities of Garenoxacin (BMS 284756) against 108 clinical isolates of Gardnerella vaginalis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46 (12): 3995-6.
13. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils.– A review. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 446.–475.
14. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food.– a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-253.

15. Daw ZY, El-Baroty GE, Mahmoud-Ebtesam A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Chem Microbiol Tehnol Lebensm* 1994; 16: 129.
16. Božin B . Antimikrobna i antioksidantna aktivnost etrskih ulja familije Lamiaceae. Magistrska teza 2004. Prirodno matematički fakultet Novi Sad, Novi Sad
17. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86: 985.–990.
18. Dean SG, Ritchie G. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol* 1987; 5: 165–180.
19. Delaquis RJ, Stanich K, Girard B, Massa G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol* 2002; 74: 101–109.
20. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 308–316.
21. Elgayyar M., Draughon FA, Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J Food Prot* 2001; 64: 1019–1024.
22. Penalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R, Perea A. Antimicrobial activity of five essential oils against strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS* 2005; 113: 1–6.
23. Mahboobi M, Shahcheraghi F, Feizabad MM. Bactericidal effects of essential oils from clove, lavender and geranium on multi-drug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, Iran *J Biotechno* 2004; 4 :137–140.
24. Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA, del-Toro-Sánchez L. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. *J Food Sci.* 2009 ;74(7) :84-91.
25. Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet J., Ankit M, Khedid K, Bachiri AE. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from eastern Morocco. *Int J Agric Biol* 2009; 11: 205–208.
26. Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. *Int J Food Microbiol* 2001; 76: 187-95.
27. Shi Y, Chen L, Tong J, Xu C (2009). Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35: 525–532.
28. Farage M, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina. *Arch Gynecol Obstet* 2006; 273: 195–202.
29. Castelo-Branco C, Cancelo MJ, Villero J, Nohales F, Juliá MD . Management of post-menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. *Maturitas* 2005; 52 (1): 46–52.
30. Cavallo G. Vaginal microbial flora and infectious pathology. *G Bacteriol Virol Immunol* 1987; 80: 277–295.
31. Patton DL, Thwin SS, Meier A, Hooton TM, Stapleton AE, Eschenbach DA . Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human

- vagina at different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 967–973.
32. Boris S, Suárez JE, Vázquez F, Barbés C . Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun* 1998; 66: 1985–1989.
 33. Vázquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G . Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2746–2749.
 34. Ya W, Reifer C, Miller LE. Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203(120): 1–6.
 35. McMillan A, Dell M, Zellar MP, Cribby S, Martz S, Hong E, et al. Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 86: 58–64.
 36. Bartlett JG, Onderdonk AB, Drude E, Goldstein C, Anderka M, Alpert S, et al. Quantitative bacteriology of the vaginal flora. *J Infect Dis* 1977; 136: 271–277.
 37. Cavallo G. Vaginal microbial flora and infectious pathology. *G Bacteriol Virol Immunol* 1987; 80: 277–295.
 38. Juárez Tomás MS, Ocaña VS, Wiese B, Nader-Macías ME. Growth and lactic acid production by vaginal Lactobacillus acidophilus CRL 1259, and inhibition of uropathogenic Escherichia coli. *J Med Microbiol* 2003; 52: 1117–1124.
 39. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM . Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 1899–1911.
 40. Afrakhteh M, Mahdavi A. Bacterial vaginosis and urinary tract infection. *J Obstet Gynecol India* 2007; 57: 513–516.
 41. Hillier S. The complexity of microbial diversity in bacterial vaginosis . *N Eng J Med* 2005; 353: 1886–1887.
 42. Osset J, Bartolomeé RM, García E, Andreu A. . Assessment of the capacity of Lactobacillus to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *J Infect Dis* 2001; 183: 485–491.
 43. Wang J . Bacterial vaginosis. Primary Care Update for OB/GYNS. *Prim Care Update Ob Gyns* 2000; 7: 181–185.
 44. Donders G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2010; 65 (7): 462-473.
 45. Aruna K, Jyoti K. Role of bacterial vaginosis in preterm labor. *J Obstet Gynecol India* 2001; 57: 413–416.
 46. Allsworth J, Peipert J. Prevalence of bacterial vaginosis: 2001-2004 national Health and Nutrition examination survey data. *American college of obstetricians and gynecologist* 2007; 109: 114-20.
 47. Nyirjesy P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22: 637-652.
 48. Money D. The laboratory diagnosis of bacterial vaginosis. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 16: 77–79.

49. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK . Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74: 14–22.
50. Rein M, Liang B . Diagnosis and treatment of infectious vaginitis. *Hospital physician* 1999; 6:45-54.
51. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL . Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 297–301.
52. Plećaš D, Stanimirović B, Stanković A, Vasiljević M . *Ginekologija i akušerstvo* 2006. Beograd: Medicinski fakultet.
53. Joesoef M, Schmid G, Hillier S . Bacterial vaginosis: Review of treatment options and potential clinical indications for therapy. *Clin Infect Dis* 1998; 28 (1): 57–65.
54. Schwabke JR, Desmond RA. Tinidazole vs metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204(211): 1–6.
55. Dickey LJ, Nailor MD, Sobel JD . Guidelines for the treatment of bacterial vaginosis: Focus on tinidazole. *Ther Clin Risk Manag* 2009; 5: 485–489.
55. Simoes JA, Aroutcheva AA, Shott S, Faro S . Effect of metronidazole on the growth of vaginal lactobacilli in vitro. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001; 9: 41–45.
56. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Mitchell CM, Marrazzo JM. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 721–726.
57. Paavonen J, Mangioni C, Martin MA, Wajszczuk P . Vaginal clindamycin and oral metronidazole for bacterial vaginosis: a randomized trial. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 256-260.
58. Sobel JD. Antibiotic consideration in bacterial vaginosis. *Current Infectious Disease Reports* 2009; 11 (6): 471-475.
59. Nyirjesy P, McIntosh MJ, Gattermeir DJ, Schumacher RJ, Steinmetz JI, Joffrion JL . The effects of intravaginal clindamycin and metronidazole therapy on vaginal lactobacilli in patients with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194(1): 277–282.
59. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Dorffel Y, Scholze J, Lochs H. et al. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198 (1): 96–97.
60. Prabhau K, Rao S, Rao V. Incidence of inducible clindamycin resistance in staphylococcus aureus isolated from clyncial samples. *J Lab Physicians* 2011; 3(1): 25-27.
61. Nagaraja P. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* in recurrent bacterial vaginosis. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26 (2): 155-159.
62. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK . Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 658–672.
63. Donders G, Bellen G, Ausma J, Verguts L, Vaneldere J, Hinoul P et al. The effect of antifungal treatment on the vaginal flora of women with vulvo-vaginal yeast

- infection with or without bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 59–63.
64. Donders G. Diagnosis and Management of Bacterial Vaginosis and Other Types of Abnormal Vaginal Bacterial Flora: A Review. *Ob Gynecological Survey* 2005; 65 (7): 462.
 65. Beigi RH, Austin MN, Meyn LA, Krohn MA, Hillier SL. Antimicrobial resistance associated with the treatment of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1124-1129.
 66. Austin MN, Beigi RH, Meyn LA, Hillier SL. Microbiologic Response to Treatment of Bacterial Vaginosis with Topical Clindamycin or Metronidazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9): 4492-4497.
 67. Wilson J. Managing recurrent bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect* 2004; 80 (1): 8–11.
 68. Hay P. Recurrent Bacterial Vaginosis. *Curr Infect Dis Rep* 2000; 2 (6): 506–512.
 69. Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J, Garland SM, Morris MB et al. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *J Infect Dis* 2006; 193: 1478–1486.
 70. Tomusiak A, Strus M, Heczko PB. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* isolated from cases of bacterial vaginosis *J Inf Ginekol Pol* 2011; 82 (12): 900-904.
 71. Chimura T, Funayama T, Murayama K, Numazaki M. Ecological treatment of bacterial vaginosis. *Jap J Antibio* 1995; 48: 432–436.
 72. Dover SE, Aroutcheva AA, Faro S, Chikindas ML. Natural antimicrobials and their role in vaginal health: A short review. *Int J Probiotics Prebiotics* 2008; 3: 219–230.
 73. Matu MN, Orinda GO, Njagi EN, Cohen CR, Bukusi EA. In vitro inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women. *Anaerobe*. 2010; 16: 210–215.
 74. Ehrström S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johannesson U, Anzén B et al. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microbes Infect* 2010; 12: 691–699.
 75. Adams R P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corp. 1995, Carol Stream (IL).
 77. Chaithongwongwatthana S, Limpongsanurak S, Sitthi-Amorn C. Single hydrogen peroxide vaginal douching versus single-dose oral metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis: a randomised controlled trial. *J Med Assoc Thai* 2003; 86: 379-384.
 78. Novakov Mikic A, Budakov D. Comparison of local metronidazole and a local antiseptic in the treatment of bacterial vaginosis. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 282: 43-47.
 79. Minozzi M, Gerli S, Di Renzo GC, Papaleo E, Ferrari A. The efficacy and safety of a single dose of polyhexamethylene biguanide gynaecologic solution versus a seven-

- dose regimen of vaginal clindamycin cream in patients with bacterial vaginosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12: 59-65.
80. Cardone A, Zarcone R, Borrelli A, Di Cunzolo A, Russo A, et al. Utilisation of hydrogen peroxide in the treatment of recurrent bacterial vaginosis. *Minerva Ginecol* 2003; 55: 483-492.
 81. Gerli S, Rossetti D, Di Renzo GC. A new approach for the treatment of bacterial vaginosis: use of polyhexamethylene biguanide. A prospective, randomized study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2003; 7: 127-130.
 82. Wewalka G, Stary A, Bosse B, Duerr HE, Reimer K. Efficacy of povidone-iodine vaginal suppositories in the treatment of bacterial vaginosis. *Dermatology* 2002; 204: 79-85.
 83. Marcone V, Rocca G, Lichtner M, Calzolari E. Long-term vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* as a complementary approach to management of bacterial vaginosis. *Int J Gynecol Obstet* 2010; 110: 223-236.
 84. Ehrström S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johannesson U, Anzén B et al. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microbes Infect* 2010; 12: 691-699.
 85. Wineslaus SJ, Calver G. Recurrent bacterial vaginosis—an old approach to a new problem. *Int J STD AIDS* 1999; 7: 284-287.
 86. Austin MN, Beigi RH, Meyn LA, Hillier SL. Microbiologic response to treatment of bacterial vaginosis with topical clindamycin or metronidazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4492-4497.
 87. Karakašević. *Mikrobiologija i Parazitologija*. Medicinska knjiga, Beograd, 1987.
 88. Pecić J. *Medicinska bakteriologija. Funkcionalna anatomija bakterija*: 15-35.
 89. Batzing, B.L. *Microbiology an introduction*. State University Collage of New York at Cortland, 2002.
 90. Jawetz, Melnick, Adelberg. *Lange Medical Microbiology*, 24th Edition: McGraw-Hill Medical 2007.
 91. Kulauzov M. *Medicinska bakteriologija 2008*. Antibakterijski lekovi: 89-117.
 92. Čomić LJ.R. *Ekologija mikroorganizama*, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 1998.
 93. Edwards DI. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 1993; 1: 9-20.
 94. Edwards DI. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. II. Mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 201-10.
 95. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Antimicrobial resistance and the management of anaerobic infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007 ; 5: 685-701.
 96. Hecht DW, Vedantam G. Anaerobe resistance among anaerobes: what now? *Anaerobe* 1999; 5: 421-429.

97. Hecht DW. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe* 2006; 12: 115–121.
98. Aldridge KE, Ashcraft D, Cambre K, Pierson CL, Jenkins SG, Rosenblatt JE. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1238–1243.
99. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, et al. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 870–876.
100. Hecht DW. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe* 2006; 12: 115–121.
101. Kirkwood M, Land, Patricia.J.Johnson . Molecular Basis of Metronidazole Resistance in Pathogenic Bacteria and Protozoa. *Drug Resistance Updates* 1999; 2, 289-294.
101. Gal M, Brazier JS. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying nim genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* 2000; 54:109–116.
102. Lofmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50: 16–23.
103. Leiros HK, Kozielski-Stuhrmann S, Kapp U, Terradot L, Leonard GA, McSweeney SM . Structural basis of 5-nitroimidazole antibiotic resistance: the crystal structure of NimA from *Deinococcus radiodurans*. *JBiol Chem* 2004; 279: 55840–55849.
104. Land KM, Johnson PJ . Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. *Drug Resist Updat* 1999; 2: 289–294.
105. Donders G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2010; 65 (7): 462-473.
106. Richard H, Beigi RH, Austin MN, Meyn LA. Antimicrobial resistance associated with the treatment of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(4): 1124–1129.
107. Austin MN, Beigi RH, Meyn LA, Hillier SL. Microbiologic Response to Treatment of Bacterial Vaginosis with Topical Clindamycin or Metronidazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (9): 4492–4497.
108. Nyirjesy P, McIntosh MJ, Gattermeir DJ, Schumacher RJ, Steinmetz JI, Joffrion JL. The effects of intravaginal clindamycin and metronidazole therapy on vaginal lactobacilli in patients with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194(5): 1277-1282.
109. Chen JY, Tian H, Beigi RH. Treatment considerations for bacterial vaginosis and the risk of recurrence. *J Womens Health (Larchmt)* 2009; 18 (12): 1997-2004.
110. Jimenez-Diaz A, Reig M, Baquero F, Ballesta JP. Antibiotic sensitivity of ribosomes from wild-type and clindamycin resistant *Bacteroides vulgatus* strains. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 295–301.

111. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, et al. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends for 1997–2000. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 126–134.
112. Cornick NA, Cuchural GJ Jr, Snyderman DR, et al. The antimicrobial susceptibility patterns of the *Bacteroides fragilis* group in the United States, 1987. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25: 1011–1019.
113. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, et al. Multicenter study of in vitro susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group, 1995 to 1996, with comparison of resistance trends from 1990 to 1996. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2417–2422.
114. Hecht DW, Osmolski JR, O’Keefe JP . Variation in the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates from six Chicago hospitals. *Clin Infect Dis* 1993; 16(4): 357–360.
115. Trinh S, Reysset G . Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol* 1996 ; 34: 2078–2084.
116. Trinh S, Haggoud A, Reysset G, Sebald M . Identification and DNA sequence of the mobilization region of the 5-nitroimidazole resistance plasmid pIP421 from *Bacteroides fragilis*. *Microbiology* 1995 ; 141:927–935.
117. Church DL, Rabin HR, Laishley EJ . Role of hydrogenase 1 of *Clostridium pasteurianum* in the reduction of metronidazole. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 1525–1534.
118. Church DL, Rabin HR, Laishley EJ. Reduction of 2-, 4- and 5-nitroimidazole drugs by hydrogenase 1 in *Clostridium pasteurianum*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25: 15–23.
119. Santangelo JD, Jones DT, Woods DR. Metronidazole activation and isolation of *Clostridium acetobutylicum* electron transport genes. *J Bacteriol* 1991 ; 173: 1088–1095.
120. Hoffman PS, Goodwin J, Johnsen K, Magee SJ . Metabolic activities of metronidazole-sensitive and resistance and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *MJ Bacteriol* 1996; 178: 4822–4829.
121. Goodwin A et al.. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase *Molecular Microbiology* 1998 ; 28: 383–393.
122. Townson SM, Boreham PF, Upcroft P, Upcroft JA. Resistance to the Nitroheterocyclic drugs. *Acta Trop* 1994; 56: 173–194.
123. Townson SM, Hanson GR, Upcroft JA, Upcroft P. A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis* *Eur J Biochem* 1994; 220: 439–446.
124. Upcroft JA, Upcroft P, Boreham PF. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol* 1990; 20: 489–496.
125. Samarawickrema NA et al. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica* *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 833–840.

126. Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem* 1999; 274: 26051–26056.
127. Quon DV, d'Oliveira CE, Johnson PJ. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89: 4402–4426.
128. Yarlett N, Yarlett NC, Lloyd D. Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 1703–1708.
129. Brown DM et al. Alternative 2-keto acid oxidoreductase activities in *Trichomonas vaginalis* *Mol Biochem Parasitol* 1999; 98: 203–214.
130. Cerkasovova A, Cerkasov J, Kulda J. Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions *Molecular and Biochemical Parasitology* 1984; 11: 105–118.
131. Leporatti ML. and Ivancheva S. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J Ethnopharmacol* 2003; 87: 123–142.
132. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*; 12(4): 564–82.
133. Borris RP. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol* 1996; 51: 29–38.
134. Moerman DE. An analysis of the food plants and drug plants of native North America. *J. Ethnopharmacol* 1996; 52: 1–22.
135. Thomson, WAR (ed.). *Medicines from the Earth*. McGraw-Hill Book Co., Maidenhead, United Kingdom, 1978.
136. Klink, B. Alternative medicines: is natural really better? *Drug Top* 1997; 141: 99–100.
137. Moerman, DE, Estabrook GF. Native Americans' choice of species for medicinal use is dependent on plant family: confirmation with meta-significance analysis. *J Ethnopharmacol*. 2003; 87(1): 51-59.
138. Holmes OW. *Currents and counter-currents in medical science, with other addresses and essays*. Ticknor & Fields, Boston, Mass, 1861.
139. Rojas A.L., Hernandez R., Pereda-Miranda R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol* 1992; 35: 275–283.
140. De Clercq E. Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clin. Microbiol. Rev* 1995;. 8: 200–239.
141. Rigoberto Rios-Esteva, Iris Lange, James M. Lee, B. Markus Lange. Mathematical Modeling-Guided Evaluation of Biochemical, Developmental, Environmental, and Genotypic Determinants of Essential Oil Composition and Yield in Peppermint Leaves¹. *Plant Physiol* 2010; 152 (4): 2105–2119.

142. Peres MTLP., Monache FD, Cruz AB, Pizzolatti MG, Yunes RA. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol* 1997; 56: 223–226.
143. Toda M, Okubo S, Ikigai H, Suzuki T, Suzuki Y, Hara Y, Shimamura T. The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol Immunol* 1992; 36: 999–1001.
144. Fernandez MA, Garcia MD, Saenz MT. Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *J. Ethnopharmacol* 1996; 53: 11–14.
145. Duke JA. Handbook of medicinal herbs. (CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla), 1985.
146. Brinkworth RI, Stoermer MJ, Fairlie DP. Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1992; 188: 631–637.
147. Taniguchi M, Kubo I. Ethnobotanical drug discovery based on medicine men's trials in the African savanna: screening of east African plants for antimicrobial activity II. *J Nat Prod* 1993; 56: 1539–1546.
148. Kubo I, Muroi H, Himejima M. Combination effects of antifungal nagilactones against *Candida albicans* and two other fungi with phenylpropanoids. *J. Nat. Prod* 1993; 56: 220–226.
149. Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Mason PK. Phlorotannin-protein interactions. *J Chem Ecol* 1996; 22: 1887–1899.
150. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 1991; 30: 3875–3883.
151. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod* 1996; 59: 205–215.
152. Brownlee HE, McEuen AR, Hedger J, Scott IM . Anti-fungal effects of cocoa tannin on the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciososa*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 1990; 36: 39–48.
153. Hoult JRS, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol* 1996; 27: 713–722.
154. Keating GJ, O'Kennedy R. The chemistry and occurrence of coumarins. in *Coumarins: biology, applications and mode of action*. eds O'Kennedy R., Thornes R. D. (John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y), p 348, 1997.
155. Cichewicz RH, Thorpe PA. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *J. Ethnopharmacol.* 1996; 52: 61–70.
156. Atta-ur-Rahman MI, Choudhary A. Diterpenoid and steroidal alkaloids. *Nat. Prod. Rep* 1995; 12: 361–379.
157. Freiburghaus F, Kaminsky R, Nkunya MHH, Brun R. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. *J. Ethnopharmacol* 1996; 55: 1–11.
158. Meyer JJM, Afolayan AJ, Taylor MB, Erasmus D . Antiviral activity of galangin from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol* 1997; 56: 165–169.

159. Zhang Y, Lewis K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol. Lett* 1997; 149: 59–64.
160. Brantner A, Males Z, Pepeljnjak S, Antolic A . Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill. *J. Ethnopharmacol* 1996; 52: 119–122.
161. Wild R. (ed.). *The complete book of natural and medicinal cures*. Rodale Press, Inc., Emmaus, Pa, 1994.
162. Duke JA. *Handbook Of Phytochemicals Constituents Of Gras Herbs And Other Economic Plants*: Boca Ration, FL: CRC PRESS, 1992.
163. Geissman TA. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds, p. 265, 1963. In M. Florkin and E. H. Stotz (ed.), *Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents*, vol. 9. Elsevier, New York, N.Y.
164. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 1991; 30: 3875–3883.
165. Urs NVR, Dunleavy JM. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans). *Phytopathology* 1975; 65: 686–690.
166. Halberstein RA. *Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns*. *AEP* 2005; 15(9): 686–699
167. Thomson, W. A. R. (ed.). (1978). *Medicines from the Earth*. McGraw-Hill Book Co., Maidenhead, United Kingdom.
168. Sierpina VS. Top twenty herbs for primary care. In: Micozzi M, ed. *York: Churchill Livingstone*; 2001:138–145.
169. Harris, R. S. Vitamins K, p. 192–198. In M. Florkin and E. Stotz (ed.), *Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents*, vol. 9. Elsevier, New York, N.Y., 1963.
170. Stern, J. L., A. E. Hagerman, P. D. Steinberg, and P. K. Mason. (1996). Phlorotannin-protein interactions. *J. Chem. Ecol.*; 22: 1887–99.
171. Dixon, R. A., P. M. Dey, C. J. Lamb. *Phytoalexins: enzymology and molecular biology*. *Adv. Enzymol* 1983; 55: 1–69.
172. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Inuma M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol* 1996; 50: 27–34.
173. Toda M., Okubo S, Ohnishi R, Shimamura T. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Jpn. J. Bacteriol* 1989;45: 561– 566.
174. Batista O, Duarte A, Nascimento J, Simoes MF. Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *J Nat Prod* 1994; 57: 858–861.
175. Vijaya K., Ananthan S, Nalini R. Antibacterial effect on theaflavin polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp.—a cell culture study. *J. Ethnopharmacol* 1995; 49: 115–118.

176. San-Blas G, San-Blas F, Marino GL, Apitz-Castro R. Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. *Antimicrob. Agents Chemother* 1989; 33: 1641–1644.
177. Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T, Kawabata S, Hamada S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res* 1993; 27: 124–129.
178. Critchfield J W, Butera ST, Folks TM. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1996;12: 39.
179. Meyer JJM, Afolayan AJ, Taylor MB, Erasmus D. Antiviral activity of galangin from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol* 1997. 56: 165–169.
180. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 1991; 30: 3875–3883.
181. Jones GA, McAllister TA, Muir AD, Cheng KJ. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* 1994; 60: 1374–1378.
182. Kaul TN, Middletown E, Ogra PL. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol* 1985; 15: 71–79.
183. Schultz JC. Tannin-insect interactions, p. 553. In R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press, New York, N.Y., 1988.
184. Hoult JRS, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol* 1996; 27: 713–722.
185. Keating GJ, O’Kennedy R. The chemistry and occurrence of coumarins, p. 348. In R. O’Kennedy and R. D. Thornes (ed.), *Coumarins: biology, applications and mode of action*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., 1997.
186. U.S. Department of Health and Human Services. National Toxicology Program technical report on the toxicology and carcinogenesis of coumarin in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). NIH publication 92-3153. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C, 1992.
187. Paris A, Strukelj B, Renko M, Turk V. Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays. *J Nat Prod* 1993; 56: 1426–1430.
188. Nonaka G-I, Nishioka I, Nishizawa M, Yamagishi T, Kashiwada Y, Dutschman GE, Bodner AJ, Kilkuskie RE, Cheng Y.C, Lee KH. Anti-AIDS agents. 2. Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J Nat Prod* 1990; 53: 587–595.
189. Omulokoli EB, Khan Chhabra SC. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol* 1997; 56: 133–137.
190. McMahon JB, Currens MJ, Gulakowski RJ, Buckheit RWJ, Lackman-Smith C, Hallock YF, Boyd MR. Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell killing by at least two distinct mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995; 39: 484–488.

191. Ghoshal S, Krishna Prasad BN, Lakshmi V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. *J. Ethnopharmacol* (1996); 50: 167–170.
192. Balls AK, Hale WS, Harris TH. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem* 1942; 19: 279–288.
193. Terras FRG, Schoofs HME, Thevissen HME, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol* 1993; 103: 1311–1319.
194. Zhang Y, Lewis K. F abatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol. Lett* 1997 ;149: 59–66.
195. De Bolle MF, Osborn RW, Goderis IJ, Noe L, Acland D, Har CA, Torrekens S, Van Leuven F, Broekar NF. Antimicrobial properties from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant Mt Mol.Biol* 1996; 31: 993–1008.
196. Zafriri D., Ofek I, Adar R, Pocino M., Sharon N. (1989). Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 33: 92–8.
197. Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *J. Ethnopharmacol* 1991; 32: 141–153.
198. Rotimi VO, Laughon BE, Bartlett JG, Mosadami HA. Activities of Nigerian chewing stick extracts against *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides melaninogenicus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1988; 32: 598–600.
199. Osato JA, Santiago LA, Remo GM, Cuadra MS, Mori A. Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya. *Life Sci* 1993; 53:1383–1389.
200. Kumar O, Singh B. Effect of ayurvedic liver stimulants on live weight gain of broilers in north eastern region. *Indian J. Anim. Res* 1992; 26: 1–5.
201. Manonmani S., William S, Subramanian S, Govindasamy S. Biochemical studies on the antidiarrhoeal effects of Cauvery-100, an ayurvedic formulation, in rats. *Biochem. Int* 1991; 24:701–708.
202. Zafriri D, Ofek I, Adar R, Pocino M, Sharon N. Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:92–98.
203. Hufford CD, Jia Y, Croom EM, Muhammed I, Okunade AL, Clark AM, Rogers RD. Antimicrobial compounds from *Petalostemum purpureum*. *J Nat Prod* 1993; 56:1878–1889.
204. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(2): 446–475.
205. Hong et al. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees *Biol. Pharm. Bull* 2004; 27: 863–866.
206. Pawar and Thaker . In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger* *Mycoses* 2006; 49: 316–323.

207. Croteau R, Kutchan T, Lewis N. Natural products (secondary metabolites). *In* B Buchanan, W Gruissem, R Joneas, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants 2000*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 1250–1268.
208. Betts A. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases *J. Chromatogr A* 2000; 936:33–46.
209. Bowles. *Chemistry of Aromatherapeutic Oils*, 174114051X Allen & Unwin, 2003.
210. Pichersky et al. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity *Science* 2003; 311:808–811.
211. Morris JA, Khettry A, Seitz EW. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J American Oil Chem Soc* 1979; 56: 595-603.
212. Mendoza L, Wilkens M, Urzua A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol* 1997; 58: 85–88.
213. Habtemariam S, Gray AI, Waterman PG. A new antibacterial sesquiterpene from *Premna oligotricha*. *J. Nat. Prod* 1993; 56: 140–143.
214. Himejima M, Hobson KR, Otsuka T, Wood DL, Kubo I. Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: a defense mechanism against microbial invasion. *J. Chem. Ecol* 1992; 18:1809–1818.
215. Mendoza L, Wilkens M, Urzua A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol* 1997 ;58: 85–88.
216. Scortichini M, Rossi MP. Preliminary in vitro evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. *J. Appl. Bacteriol* 1991; 71:109–112.
217. Harrigan GG, Ahmad A, Baj N, Glass TE, Gunatilaka AAL, Kingston DGI. (1993). Bioactive and other sesquiterpenoids from *Porella cordeana*. *J Nat Prod* 1993 ;56:921–925.
218. Kubo I, Muroi H, Himejima M. Combination effects of antifungal nagilactones against *Candida albicans* and two other fungi with phenylpropanoids. *J Nat Prod* 1993; 56: 220–226.
219. Suresh B, Sriram S, Dhanaraj SA, Elango K, Chinnaswamy K. Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *J. Ethnopharmacol* 1997; 55: 151–159.
220. Ghoshal S, Prasad BN, Lakshmi V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. *J. Ethnopharmacol* 1996; 50:167–170.
221. Vishwakarma RA. Stereoselective synthesis of a-artether from artemisinin. *J. Nat. Prod* 1990; 53: 216–217.
222. Chaurasia SC, Vyas KK. In vitro effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. *J. Res. Indian Med. Yoga Homeopath* 1977:24–26.
223. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 130–135.

224. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 91: 453-462.
225. Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 1561-1568.
226. Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International J Food Microbiol* 2002; 74: 101-109.
227. Lens-Lisbonne C, Cremieux A, Maillard C, Balansard G. Methodes d'evaluation de l'activite' antibacterienne des huiles essentielles: application aux essences de thym et de cannelle. *Journal de Pharmacie de Belgique* 1987;42 (5): 297- 302.
228. Prudent D, Perineau F, Bessiere JM, Michel GM, Baccou JC. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.)—evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research* 1995; 7: 165- 173.
229. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J Agr Food Chem* 1996; 44: 1202-1205.
230. Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. *J Agr Food Chem* 1998; 46: 3741- 3746.
231. Demetzos C., Perdetzoglou D.K. (2001). Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O.scabrum* Boiss. et Heldr. from Greece. *Journal of Essential Oil Research* ;13: 460- 462.
232. Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 187- 195.
233. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agr Food Chem* 2000; 48: 2576-2581.
234. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* 2003; 22: 39- 44.
235. Bauer K, Garbe D, Surburg H. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. Wiley-VCH 2001, Weinheim, p. 293.
236. McGimpsey JA, Douglas MH, Van Klink JL, Beauregard DA, Perry NB. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour Frag J* 1994; 9: 347- 352.
237. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 130- 135.

238. Marino M, Bersani C, Comi G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J Food Protect* 1999; 62 (9): 1017– 1023.
239. Juliano C, Mattana A, Usai M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *J Ess Oil Res* 2000;12: 516–522.
240. Hong EJ, Na KJ, Choi IG, Choi KC, Jeung E.B. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 863–866.
241. Sartorelli P, Marquioreto AD, Amaral-Baroli A, Lima ME, Moreno PR. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytother. Res* 2007; 21: 231–233
242. Silva NCC , Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Trop Dis* 2010; 16(3): 402-413.
243. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J. Agric. Food Chem* 2004; 52: 2485–2489.
244. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Character-ization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem* 2006 ;54: 1822–1828.
245. Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J. Food Prot* 2004; 67: 1252–1256.
246. Sonboli A, Mirjalili MH, Hadian J, Ebrahimi SN, Yousefzadi M. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *bungeana* (Juz.) Rech. f. from Iran. *Z. Naturforsch* 2006; 61: 677–680.
247. Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Echard BW, Bagchi D, Preuss HG. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans* . *Mol. Cell. Biochem* 2001; 228: 111–117.
248. Bouchra C, Achouri M, Idrissi Hassani LM, Hmamouchi M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *J. Ethnophar-macol* 2003; 89: 165–169.
249. Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* . *Food Microbiol* 2004; 21: 33–42.
250. Kubo I, Fujita K, Kubo A, Nihei K, Ogura T. Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella cholerae-suis*. *J. Agric. Food Chem* 2004; 52: 3329–3332.
251. Singh G, Kapoor IP, Pandey SK, Singh UK, Singh RK. Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytother. Res* 2002; 16: 680–682.
252. Basilico MZ, Basilico JC. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Lett. Appl. Microbiol* 1999; 29: 238–241.

253. Pawar VC, Thaker VS. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger* . *Mycoses* 2006;49: 316–323.
254. Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ, Montenegro D, Heukelbach J, Rao VS, Brito GA. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz. J. Med. Biol. Res* 2007; 40: 349–356.
255. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Compl. Altern. Med* 2006; 6: 39.
256. Tepe B, Daferera D, Sokmen M, Polissiou M, Sokmen A. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of *Origanum syriacum* L. var. *bevanii*. *J Sci Food Agric* 2004 ;84 :1389–1396.
257. Tepe B, Daferera D, Sökmen M, Polissiou M, Sökmen A. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M Zohary et P.H. Davis. *J Agric Food Chem* 2004 ;52: 1132–1137.
258. Lo Cantore P, Iacobellis NS, De Marco A, Capasso F, Senatore F . Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) essential oils. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 7862–7866.
259. Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Int J Aromather* 2006; 16: 95–100.
260. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, AntoniettaMilillo M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* 2007; 14: 727–732.
261. Duarte MC, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli* . *J. Ethnopharmacol* 2007; 111: 197–201.
262. Mimica-Dukic N, Kujundzic S, Sokovic M, Couladis M. Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother Res* 2003; 17: 368–371.
263. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88 (2): 308-316.
264. Arras G, Piga A. Effect of TBZ, Acetaldehyde, Citral and *Thymus Capitatus* Essential Oil on 'Minneola' Tangelo Fruit Decay Proc. *Int Soc Citriculture* 1996: 406-409.
265. Magiatisa P, Skaltsounis A-L., Chinoua I ,Haroutounianb S.A. Chemical Composition and in-vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Three Greek *Achillea* Species *Z. Naturforsch.*2002; 57: 287-290.
266. Shiyab S, Shatnawi M, Al-Zweiri SM, Akash M, Aburijai T. Influence of developmental stage on yield and composition of *Origanum syriacum* L. oil by multivariate analysis . *J Med Plants Res* 2012; 6 (15) :2985-2994.
267. Kotana R, Kordalic S, Cakird AZ. Screening of Antibacterial Activities of Twenty-One Oxygenated Monoterpenes. *Naturforsch* 2007; 62: 505-513.

267. Upadhyay RK, Dwivedi P, Ahmad S. Screening of Antibacterial Activity of Six Plant Essential Oils Against Pathogenic Bacterial Strains. *Asian J Med Sci* 2001; 2 (3): 152-158.
268. Skandamis PN, Nychas GJE. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 1011-1022.
269. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1914–1920.
270. Acamovic T, Brooker JD. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *J Nutr Soc* 2005; 64: 403–412.
271. Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LG, Von Wright A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agr Food Chem* 1998; 46: 3590–3595.
272. Nikaido H. Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. *SCIENCE* 1994; 264: 382-388.
273. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro M.G., Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob Agents Ch* 2005: 2474–2478.
274. Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essen. Oil Res.* ;1, 119–128.
275. Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 8022–8028.
276. Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Von Wright A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 3590–3595.
277. Ultee A, Kets EP, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol* 2000; 174: 233–238.
278. Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 4863–487.
279. Turina AV, Nolan MV, Zygodlo JA, Perillo MA. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem* 2006; 122: 101–113.
280. Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham JL, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 1998; 26: 194–198.
281. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Rep.* 1997; 17: 43–52.
282. Sakagami H, Satoh K. Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. *Anticancer Res* 1997; 17: 221–22.

283. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 2002;177: 67–80.
284. Del Rio JM., Velez-Pardo C. Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an in vitro model for neurodegeneration. *Arch Med Res* 2004; 35: 185–193.
285. Azmi AS, Bhat SH, Hanif S, Hadi SM. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett* 2006; 580: 533–538.
286. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48: 3597–3604.
287. Sakagami H, Oi T, Satoh K. Prevention of oral diseases by polyphenols (Review). *In vivo* 1999 ;13: 155–172.
288. Barbehenn R, Cheek S, Gasperut A, Lister E, Maben R. Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. *J Chem Ecol* 2005; 31: 969–988.
289. Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham JL, Bell HC. Wyllie SG, Warmington JR. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett Appl. Microbiol* 1998; 26: 194–198.
290. Nostro A, Roccaro SA, Bisignano G, Cannatell MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Blanco FPAR. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Med Microbiol* 2007; 56(4) :519-523.
291. Denyer S.P., Hugo W.B. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford 1991, pp. 171– 188.
292. Denich TJ, Beaudette LA, Lee H, Trevors JT. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Methods*. 2003; 52(2): 149-82.
293. Davidson PM. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM, Washington 1997, pp. 520–556.
294. Wendakoon CN, Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Protect* 1995; 58 (3): 280– 283.
295. Pol IE, Mastwijk HC, Slump RA, Popa ME, Smid EJ. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *J Food Protect* 2001;64 (7): 1012– 1018.
296. Juven BJ., Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 1994; 76 :626– 631.

297. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Food Microbiol* 1998; 26: 118–122.
298. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol* 2001 ;18: 463– 470.
299. Zani F, Massino G, Benvenuti S, Bianchi A, Albasini A, Melegari M, Vampa G, Bellotti A, Mazza P. Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Planta Med.*1991; 57: 237–241.
300. Shelef LA. Antimicrobial effects of spices. *J Food Safety* 1983; 6: 29– 44.
301. Shelef LA, Jyothi EK, Bulgarelli MA. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *J Food Sci* 1984; 49 (737–740): 809.
302. Farag RS, Daw ZY, Hewedi FM, El-Baroty GSA. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J Food Protect* 1989;52 (9): 665– 667.
303. Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem* 2000; 69: 167–174.
304. Senatore F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J Agricult Food Chem* 1996;44: 1327– 1332.
305. Senatore F, Napolitano F, Ozcan M. Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour Frag J* 2000;15: 186– 189.
306. Canillac N, Mourey A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 2001;18: 261– 268.
307. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totte' J, Pieters L, Vlietinck A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 2002 ;79: 213– 220.
308. Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Chessa M, Cerri R, Casanova J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Frag J* 2002; 17: 15– 19.
309. Harpaz S, Glatman L, Drabkin V, Gelman A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J Food Protect* 2003; 66 (3): 410–417.
310. Ratledge C, Wilkinson SG. An overview of microbial lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds.), *Microbial Lipids*, vol. 1. Academic Press, London, 1988: pp. 3– 22.
311. Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.-M., Vogenschow, H. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.J. (Ed.), *Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils*. De Gruyter, Berlin, 1986:pp. 429– 445.
312. Deans SG, Ritchie G. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol* 1987; 5: 165– 180.

313. Paster N, Juven BJ, Shaaya E, Menasherov M, Nitzan R, Weisslowicz H, Ravid U. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Lett Appl Microbiol* 1990;11: 33–37.
314. Lis-Balchin M, Ochoka RJ, Deans SG, Asztemborska M, Hart S. Differences in bioactivity between the enantiomers of α -pinene. *J Ess Oil Res* 1999; 11: 393– 397.
315. Tsigarida E, Skandamis P, Nychas GJE. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 jC. *J Appl Microbiol* 2000; 89: 901–909.
316. Wilkinson JM, Hipwell M, Ryan T, Cavanagh HMA. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *J Agricult Food Chem* 2003;51 :76–81.
317. Longbottom CJ, Carson CF, Hammer KA, Mee BJ, Rile TV. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 54: 386–392.
318. NCCLS.– National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2001): Performance standards for anti-microbial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA.
319. NCCLS.– National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003): Performance standards for anti-microbial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Document M100-S11.
320. Rios JL., Recio MC., Villar A. Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol* 1998; 23: 127– 149.
321. Janssen AM, Scheffer JJC, Baerheim Svendsen A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976– 1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica* 1987; 53: 396–398.
322. Friedman M, Henika, PR, Mandrell RE.. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 2002; 65 (10): 1545– 1560.
323. Gill AO, Delaquis P, Russo P, Holley RA. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int J Food Microbiol* 2002;73: 83– 92.
324. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 2003;36 (3): 162– 167.
325. Tassou, C, Drosinos, EH, Nychas, G.-JE. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. *Journal of Applied Bacteriology* 1995; 78: 593– 600.
326. Tassou C, Koutsoumanis K, Nychas G-JE. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint es ential oil. *Food Research International* 2000; 33: 273– 280.

327. Pol IE, Smid EJ. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 1999; 29: 166– 170.
328. Periago PM, Moezelaar R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the variability of different strains of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* 2001; 68: 141– 148.
329. Periago PM, Palop A, Fernandez PS. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Sci Technol Int* 2001; 7 (6): 487– 492.
330. Aureli P, Costantini A, Zolea S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect* 1992 ;55 (5): 344–348.
331. Azzouz MA, Bullerman LB. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *J Food Protect* 1982; 45 (14): 1298–1301.
332. Akgu" l A, Kivanc M. Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. *Int J Food Microbiol* 1998; 6: 263– 268.
333. Ismaiel AA, Pierson MD. Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. *Journal of Food Protection* 1990; 53 (11): 958– 960.
334. Valero A, Hervás C, García-Gimeno RM, Zurera G. Product unit neural networks models for predicting the growth limits of *Listeria monocytogenes* . *Food Microbiology* 2007; 24: 452–464.
335. Bennis S, Chami F, Chami N, Bouchikhi R . Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 2004; 38: 454-458.
336. Eisenreich M, Shwartz M, Catayrade A, Arigoni D, Zenk MH, Baher A. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem. Microbiol. Tehnol. Lebensm.*1998; 5: 255-233.
337. Omer K, Khattab ME, Ibrahim ME. First cultivation trial of *Perilla frutescens* L. in Egypt. *Flavour Fragr J* 1998; 13: 221-225.
338. Deans SG, Simpson E, Noble RC, MacPherson A, Penzes L. Natural antioxidants from *Thymus vulgaris* (thyme) volatile oil: the beneficial effects upon mammalian lipid metabolism. *Acta Horticulturae* 1993; 332: 177– 182.
339. Carson CF, Hammer KA, Riley TV . Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios* 1995; 82: 181–185.
340. Canillac N, Mourey A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 2001; 18: 261.– 268.
341. KanY, UcanUS, Kartal M,Altun ML, Aslen S, Sayar E., Ceyhan T. GC-MS Analysis and Antibacterial Activity of Cultivated *Satureja cuneifolia* Ten. Essential Oil. *Turk Journal of Chemistry* 2006; 30: 253-259.
342. Tolossa K, Asres K, El-Fiky FK, Singab ANB, Bucar F. Composition of the essential oils of *Satureja abyssinica* ssp *abyssinica* and *Satureja paradoxa*: Their antimicrobial and radical scavenging activities. *J Ess Oil Res* 2007; 19 (3): 295-300.

343. Skočibušić M, Bežić N. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry* 2006; 96: 20-28.
344. Skočibušić M, Beži, N. Chemical Composition and Antimicrobial Variability of *Satureja montana* L. Essential Oils Produced During Ontogenesis. *J Ess Oil Res* 2000; 16: 387-391.
345. Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, Agnew K, et al. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis.*2000; 30: 901–7.
346. Richardson JL, Illum L. The vaginal route of peptide and protein drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*1992; 8: 341–366
347. Roumen F. Contraceptive efficacy and tolerability with a novel combined contraceptive vaginal ring, NuvaRing. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care* 2002; 7(2): 19–24.
348. Malcolm K, Woolfson D, Russell J, Tallon P, McAuley L, Craig D. Influence of silicone elastomer solubility and diffusivity on the in vitro release of drugs from intravaginal rings. *J Control Release* 2003; 90: 217–225.
349. Shah JC, Sadhale Y, Chilukuri DM. Cubic phase gels as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev* 2001; 47:229–250.
350. Shah K.R.Hydrophilic polystyrene graft copolymer vehicle for intravaginal administration of pharmacologically active agents; U. S. 5814;329, 1998.
351. Hummelen R, Changalucha J, Butamanya NL, Cook A, Habbema JD, Reid G. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L.reuteri* RC-14 to prevent or cure bacterial vaginosis among women with HIV.*Int J Gynecol Obstet* 2010; 111: 245–248.
352. Junginger HE. Bioadhesive polymer systems for peptide delivery, *Acta Pharm. Technol* 1990; 36: 110–126.
353. Ch'ng HS, Park H, Kelly P, Robinson R. Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery: II. Synthesis and evaluation of some swelling water insoluble bioadhesive polymers, *J. Pharm. Sci* 1985;74 :399–405.
354. Lehr CM. Bioadhesion technologies for the controlled delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst* 1995; 11: 177–218.
355. Desphande A, Rhodes CT, Danish M. Intravaginal drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.*1992; 18 :1225–1279.
356. M.H. Burgos, C.E.R. Linares, Ultrastructure of the vaginal mucosa, in: E.S.E. Hafez, T.N. Evans (Eds.), *The Human Vagina*, North Holland Publishing Company, 1978.
357. Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery . *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1692–1712.
358. Bombart F. Aqueous vaginal douche compositions. WO 9210998 A1 19920709,1992.
359. Ghelardi E, Tvanti A, Lupetti A, Felandroni F, Boldrini E, Campa M, Senesi S. Control of *Candida albicans* murine vaginitis by topical administration of

- polycarbophil-econazole complex, *Antimicrob. Agents Chemother* 1998; 42 :2434–2436.
360. Lejoyeux G, Ponchel D, Wouessidjewe NA, Peppas D, Duchene D. Adhesive tablets—influence of the testing medium composition on bioadhesion. *Drug Dev. Ind. Pharm* 1998; 15: 2037–2048.
 361. Yu-Kyoung O, Jeong-Sook P, Ho YP, Chong-Kook K. Enhanced mucosal and systemic immune responses to a vaginal vaccine coadministered with RANTES expressing plasmid DNA using in situ-gelling mucoadhesive delivery system. *Vaccine* 2003 21: 1980–1988.
 362. Jung YC, Oh YK, Soo Kong H, Jung Kim E, Dong DJ, Ki TN. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis, *J. Control. Release* 2000; 82 :39–50.
 363. Toner JP. Vaginal delivery of progesterone in donor oocyte therapy. *Hum. Reprod* 2000; 15:166–171.
 364. Ludwig M, Schwartz P, Babahan B, Katalinic A, Weiss J.M., Felberbaum R, Al-Hasani S, Diedrich K. Luteal phase support using either Crinone 8% or Utrogest: results of a prospective, randomized study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2002;103 : 48–52.
 365. Casanas-Roux F, Nisolle M, Marbaix E, Smets M, Bassil S, Donnez J. Morphometric, immunohistological and three-dimensional evaluation of the endometrium of menopausal women treated by oestrogen and Crinone, a new slow-release vaginal progesterone. *Hum. Reprod* 1996; 11: 357–363.
 366. Valenta C, Kast C, Harich I, Bernkop-Schnürch A. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. *J. Control. Release* 2001; 77 :323–332.
 367. Han K, Park JS, Chung YB., Jeong NJP., Park H.B., Robinson JR. Development of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) delivery systems for vaginal mucosal route. *Arch Pharm Res* 1995; 18 : 325–331.
 368. Valenta C, Marschütz M, Egyed C, Bernkop-Schnürch A. Evaluation of the inhibitory effect of thiolated poly (acrylates) on vaginal membrane bound aminopeptidase N. *J. Pharm. Pharmacol* 2002; 54 :603–610.
 369. Richardson L, Illum L. Routes of delivery: case studies, *Adv. Drug Deliv. Rev* 1992;8: 341–366.
 370. Morimoto K, Takeeda T, Nakamoto Y, Morisaka K. Effective vaginal absorption of insulin in diabetic rats and rabbits using polyacrylic acid aqueous gel bases. *Int J Pharm* 1982 ;12 :107–111.
 371. Singla AK, Chawala M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects—an update: *J. Pharm. Pharmacol* 2001;53 :1047–1167.
 372. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res* 1998; 15: 155-158..
 373. Dodane V., Vilivalam V.D.(1999). Pharmaceutical applications of chitosan, *Pharm. Sci. Technol. Today* ;1 : 246–253.

374. Kim KW, Thomas RL, Lee C, Park HJ. Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and O-carboxymethylated chitosan. *J Food Prot* 2003; 66 :1495–1498.
375. Luessen HL, de Leeuw BJ, Langemeyer MW, de Boer A., Verhoef JC, Junginger HE.. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery: VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo, *Pharm Res* 1996;13 :1668–1672.
376. Chandy T, Sharma CP. Chitosan—as a biomaterial biomater. *Artif. Cells Artif Organs* 1990;18: 1–24.
368. Chellat F, Tabrizian M, Dumitriu S, Chornet E, Rivard CH, Yahia L. Study of biodegradation behavior of chitosan–xanthan microspheres in simulated physiological media. *J. Biomed. Mater. Res* 2000; 53: 592–599.
369. Senel S., McClure S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1467-1480.
370. Kast CE, Valenta C, Leopold M, Bernkop-Schnürch A. Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole, *J. Control. Release* 2002; 81: 347–354.
371. Khanvilkar K., Donovan M.D., Flanagan D.R. Drug transfer through mucus. *Adv. Drug Deliv Rev* 2001; 48 :173–193.
372. Lanchares JL, Hernandez ML. Recurrent vaginal candidiasis changes in etiopathogenical patterns. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 71 : 29–35.
373. Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 71 :21–27.
374. Bernkop-Schnürch A, Hornof M, Zoidl T. Thiolated polymers- Thiomers: Modification of chitosan with 2-iminothio-lane. *Int J Pharm* 2003; 260 : 229–237.
375. Duchene D, Ponchel G. Principle and investigation of the bioadhesion mechanism of solid dosage forms. *Biomaterials* 1992;13 :709–714.
376. Poncelet I.D., Neufeld R.J., (1995). Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and crosslinked chitosan membranes for in vivo application. *Appl. Biochem. Biotechnol.* ;50: 93–106.
377. Al-Helw AA, Al-Angary AA, Mahrous GM, Al-Dardari MM. Preparation and evaluation of sustained release cross-linked chitosan microspheres containing phenobarbitone. *J Microencapsul* 1998; 15: 373–382.
378. Al-Suwayeh SA, el-Helw AR, al-Mesned AF, Bayomi MA, el-Gorashi AS. In vitro–in vivo evaluation of tableted caseinchitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride. *Boll Chim Farm* 2003; 142: 14–20.
379. Berthold A, Cremer K, Kreuter J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *J. Control Release* 1996; 39: 17–25.
380. Sunil AA, Nadagouda NM, Tejjraj M. Aminabhavi . Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release* 2004; 100(1): 5–28.

381. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs .*Int J Pharm* 2004; 274(1–2): 1–33.
382. Pendekal MS.and Tegginamat PK.Development and characterization of chitosan-polycarbophil interpolyelectrolyte complex-based 5-fluorouracil formulations for buccal, vaginal and rectal application *DARU. J Pharm Sci* 2012; 20: 67.
383. Abruzzo A, Bigucci F, Cerchiara T, Saladini B, Gallucci MC, Cruciani F, Vitali B, Luppi B. Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate *Carbohydr Polym* 2013; 91 (2):651-8.
384. Jianing M, Timothy F. Sturgis, Bi-Botti C. Youan Engineering .(Tenofovir Loaded Chitosan Nanoparticles *Eur J Pharm Sci* 2011; 44 (1-2): 57–67.
385. Perioli L, Ambrogi V, Pagano C, Scuota S, Rossi C. FG90 chitosan as a new polymer for metronidazole mucoadhesive tablets for vaginal administration *Int J Pharm* 2009; 377 (1-2): 120-127.
386. Albertini B, Passerini N, Di Sabatino M, Vitali B, Brigidi P, Rodriguez L.Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate *Eur J Pharm Sci* 2009; 36 (4-5): 591-601.
387. Małolepsza-Jarmołowska K. Studies on gynecological hydrophilic lactic acid preparations. Part 8: use of chitosan as lactic acid carrier in intravaginal tablets *Acta Pol Pharm* 2007;64 (1):69-72.
388. Kawarkhe S, Poddar SS. Designing of the mucoadhesive intravaginal spermicidal films *Indian J Pharm Sci* 2010;7 2 (5): 652-655.
389. Değim Z, Değim T, Acartürk F, Erdoğan D, Ozoğul C, Köksal M. Rectal and vaginal administration of insulin-chitosan formulations: an experimental study in rabbits. *J Drug Target* 2005; 13 (10): 563-572.
390. Gavini E, Sanna V, Juliano C, Bonferoni MC, Giunchedi P. Mucoadhesive vaginal tablets as veterinary delivery system for the controlled release of an antimicrobial drug, acriflavine AAPS. *Pharm Sci Tech* 2003;3 (3): 20.
391. Kast CE, Valenta C, Leopold M, Bernkop-Schnürch A. Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole. *J Control Release* 2002;81 (3): 347-354.
392. Hirnle L, Heimrath J, Woytoń J, Klósek A, Hirnle G, Małolepsza-Jarmołowska K. Application of 2% clindamycin cream in the treatment of bacterial vaginosis and valuation of methylcellulose gel containing the complex of Chitosan F and PVP k-90 with lactic acid as carrier for intravaginally adhbited medicines in the cases of pregnancies with the symptoms of preterm delivery. *Ginekol Pol* 2001;72 (12):1096-1100.
393. A. São Pedro, Espirito Santo E, Silva CV, Detoni C, Albuquerque E. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.) © FORMATEX 2013: 1364-1374.
394. Kamble VA, Jagdale DM, Kadam VJ. Solid lipid nanoparticles as drug delivery system. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2010;1:1-9

395. Liang R, Xu S, Shoemaker CF, Li Y, Zhong F, Huang Q. Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint Oil Nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60:7548-7555.
396. Zhang L, Pornpattananangkul D, Hu C-M, Huang C-M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current Medicinal Chemistry*. 2010;17:585-594.
397. Peppas LB. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in the controlled drug delivery. *Int J Pharm* 1995; 116 :. 1–9.
398. Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger H.E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm* 1992; 78 :43–48.
399. Illum L, Farraj NF, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm Res* 1994; 11: 1186–1189.
400. Imai T, Shiraishi S, Saito H, Otagiri M. Interaction of indomethacin with low molecular weight chitosan, and improvements of some pharmaceutical properties of indomethacin by low molecular weight chitosans. *Int J Pharm* 1991; 67 ; 11–20.
401. Genta I, Pavanetto F, Conti B, Giunchedi P, Conte U. Spray-drying for the preparation of chitosan microspheres *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater* 1994; 21: 616–617.
402. Sawayanagi Y, Nambu T., Nagai T. Enhancement of dissolution properties of prednisolone from ground mixtures with chitin or chitosan. *Chem. Pharm. Bull* 1983; 31 :2507–2509.
403. Gallo JM, Hassan EE. Receptor-mediated magnetic carriers: basis for targeting. *Pharm Res* 1998; 5: 300–304.
404. Hassan EE, Parish RC, Gallo JM. Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anticancer agent, oxantrazole *Pharm. Res* 1992; 9: 390–397.
405. Artursson P, Lindmark T, Davis SS, Lillum L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (CACO-2) *Pharm Res* 1994; 11: 1358–1361.
406. Jameela SR, Kumary TV, Lal AV, Jayakrishnan A. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system *J. Control. Release* 1998; 52: 17–24.
407. Kumbar SG, Kulkarni AR. Cross-linked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of cross-linking agent. *J Microencapsulation* 2002; 19: 173–180.
408. Van den Dool H, Kratz DPA. Generalisation of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J. Chromatograph* 1963; 11: 463-471.
409. Adams RP. Identification of Essential Oil Component by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 2007.

410. Krstić B, Marjanović N. Instrumentalne metode u biološkim istraživanjima. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki i Prirodno-matematički fakultet. Novi Sad 2002: 74-77 p.
411. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: CLSI; 2005.
412. Thoroski J, Blank G, Biliaderis C. Eugenol induced in hibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *J Food Protect* 1989; 52 (6): 399 – 403.
413. Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Von Wright A. Characterization of the action of selected essential oil compnents on Gram-negative bacteria. *J Agricult Food Chem* 1998; 46: 3590 – 3595.
414. Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Ess Oil Res* 1989; 1; 119 – 128.
415. Oosterhaven K, Poolman B, Smid EJ . S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Ind Crop Prod* 1995; 4: 23 – 31.
416. Ultee A, Kets EPW, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65 (10), 4606 – 4610.
417. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000; 88: 170 – 175.
418. Denyer SP, Hugo WB. Mechanisms of antibacterial action—A summary. In Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. Blackwell, Oxford, pp. 331 – 334, 1991b.
419. Pelczar MJ, Chan ECS and Krieg NR. Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents. In *Microbiology* pp. 469–509. New York: McGraw-Hill International, 1988.
420. Nadal NGM, Montalvo AE and Seda M. Antimicrobial properties of bay and other phenolic essential oils. *Cosm Perfumery* 1973; 88: 37–38.
421. Suresh P, Ingle VK and Vijayalakshima V. Antibacterial activity of eugenol in comparison with other antibiotics. *J Food Sci Technol* 1992; 29, 254–256.
422. Mahmoud AL. Antifungal action and aflatoxicogenic properties of some essential oil constituents. *Lett Appl Microbiol* 1994; 19: 110–113.
423. Shapiro S, Meier A and Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 202–204.
424. Hili P, Evans CS, Veness RG. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24: 269–275.
425. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 564-82.
426. Mendoza L, Wilkens M, Urzua A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 1997; 58: 85–88.

427. Inouye S, Yamaguchi H, Takizawa T. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J Infect Chemother* 2001;7 (4):251-4.
428. Ben A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol* 2006; 43(2) : 149–154.
429. Lanciotti R, Gianotti A, Patrignani F, Belletti N . Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends Food Sci. Technol* 2003; 15: 201-208.
430. Rhayour K, Bo2uchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Sendide K, Remmal A. The Mechanism of Bactericidal Action of Oregano and Clove Essential Oils and of Their Phenolic Major Components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Ess Oil Res* 2003; 15(5): 225-232.
431. Penalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R and Perea A. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS* 2005; 113 (1): 1-6.
432. Santoyo S, M. Herrero FJ, Senorans A, Cifuentes E I and Jaime L. Funcional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. *Eur. Food Res. Technol* 2006; 224: 75-81.
433. Gaysinsky S, Davidson PM, Bruce BD, Weiss J. Growth inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. *J. Food Prot* 2005; 68: 2259-2566.
434. Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mitaku S, Nychas GJ and Haroutounian SA. Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. *J Agricult Food Chem* 2004; 52: 8261-8267.
435. Kurita N, Miyaji M, Kurane R, Takahara Y and Ichimura K . Antifungal activity of components of essential oils. *Agricult Biologic Chem* 1981; 45: 945–952.
436. Sarabi-Jamab M. and Niazmand R. Effect of Essential Oil of *Mentha piperita* and *Ziziphora clinopodioides* on *Lactobacillus acidophilus* Activity as Bioyogurt Starter Culture. *American-Eurasian J Agric & Environ Sci* 2009; 6 (2): 129-131.
437. Roldan LP, Diaz GD, Durringer JM. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2010; 23:451-461.
438. Ouwehand A.C., Tiihonen K, Kettunen H, Peuranen S, Schulze H, Rautonen N. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Vet Med –CZECH* 2010; 55(2): 71–78.
439. Elaissi A, Rouis Z, Mabrouk S, Bel Haj Salah K, Aouni M, Larbi Khouja M, Farhat F, Chemli R and Harzallah-Skhiri F. Correlation Between Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Fifteen *Eucalyptus* Species Growing in the Korbous and Jbel Abderrahman Arboreta (North East Tunisia). *Molecules* 2012; 17, 3044-3057.
440. Ghasemi P.A., Rahimmalek M, Malekpoor F and Karimi A. Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. *Plant Omics J* 2011; 4 (4): 209-214.

441. Cleff M B, Madrid I, Raquel Meinerz A, Carlos Araújo Meireles M, Braga de Mello JR, Regina Rodrigues M and Hernández Escareño JJ. Essential oils against *Candida* spp: in vitro antifungal activity of *Origanum vulgare*. *Afr J Microbiol Res* 2013; 7(20): 2245-2250.
442. Braga PS. Thymol: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. *Giorn It Ost Gin* 2005; 22: 7-8.
443. Adams A, Kumar S, Clauson M, Sahi S. Anti-yeast activities of *Origanum* oil against human pathogenic yeasts. *Adv Biosci Biotech* 2011; 2: 103-107.
444. Eftekhara F, Fereshteh Raeia F, Yousefzadib M, Nejad Ebrahimic S, Hadiand J. Antibacterial Activity and Essential Oil Composition of *Satureja spicigera* from Iran, *Z Naturforsch C*.2009; (1-2): 20-24.
445. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 1999; 56 (3): 395-411.
446. Lian-Ying Z, Jiang-Feng Z . Study on antimicrobial activity of chitosan with differnt molecular weights, *Carbohydr Polym* 2003; 54: 527-530.
447. Raafat D, Von Brgen K, Haas A. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 3764-3773.
448. Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM . Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Food Sci Technol-LEB* 2005;.38: 859 -865.
449. Goy RC; de Britto D; Odilio BG. Assis A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 2009; 19: 241-247.