



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Bugarin Dušan

**ANTIOKSIDANTNI, ANTIMIKROBNI I
ANTIMUTAGENI POTENCIJAL VRSTE
*MYRTUS COMMUNIS L.***

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

Novi Sad, 2010.

Eksperimentalni dio ovog rada urađen je u laboratorijama sledećih institucija:

- Laboratorija za biohemiju biljaka, Departman za hemiju, Prirodno-matematički fakultet- Novi Sad,
- Laboratorija za mikrobiologiju, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu,
- Herbarijum Departmana za biologiju i ekologiju (BUNS), Prirodno-matematički fakultet-Novu Sad.

Terenska istraživanja, neophodna za izradu disertacije, odvijala su se od 2003. do 2008. godine u okviru realizacije projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije br. 142036.

Želim da izrazim svoju toplu i veliku zahvalnost sledećim osobama, koje su pomogle u toku ovog istraživanja:

Za nesebičnu i veoma dragocenu pomoć od prvih dana našeg poznanstva, za veliko znanje koje mi još uvijek nesebično prenosi, prijateljstvo, za sveobuhvatno nadgledanje, otvorenost i želju da savetuje i sluša komentare na različite teme ovog rada kao i maksimalnu podršku koju mi je pružila u toku izrade, oblikovanja i pisanja ovog rada dugujem svom mentoru, prof. dr Nedi Mimici-Dukić, dekanu PMF-a u Novom Sadu.

Veliku zahvalnost za ukazano povjerenje, prijateljstvo, otvorenost, za spremnost da mi izađu u susret svaki put kada mi je bilo potrebno, dugujem prof. dr Jeleni Knežević-Vukčević, dekanu Biološkog fakulteta u Beogradu, kao i prof. dr Branki Vuković-Gačić vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu,.

Duboku zahvalnost dugujem prof. dr Miri Popović na dragocenoj pomoći i podršci u toku izrade ove disertacije, kao i na toplini i ljubavi koju širi oko sebe.

Posebno želim da se zahvalim stručnom saradniku laboratorije za biohemiju biljaka, Departmana za hemiju, PMF-a u Novom Sadu, Emiliji Jovin, kao i asistentu katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta u Beogradu, mr Dragani Mitić-Ćulafić, na nesebičnoj pomoći koju su mi pružili u svim fazama izrade ovog rada.

Na nesebičnoj pomoći i prijateljskoj podršci, od početka do kraja izrade ove disertacije, posebno se zahvaljujem kolegi Slavenku Grboviću.

Takođe, veliku zahvalnost na pomoći u pojedinim fazama izrade ovog rada dugujem i asistentu Dr Goranu Anačkovu sa Departmana za biologiju i ekologiju PMF-a u Novom

Sadu, asistentu dr Biljani Božin sa zavoda za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, dr Danijeli Stešević sa odsjeka za biologiju PMF-a, i prof. dr Miću Radoviću profesoru ekonomskog fakulteta Univerziteta Crne Gore, Dejanu Orčiću, stručnom saradniku laboratorije za biohemiju biljaka, Departmana za hemiju, PMF-a u Novom Sadu, Kristini Balog, laborantu laboratorije za biohemiju biljaka, Departmana za hemiju, PMF-a u Novom Sadu, kao i svima ostalima koji su izrazili svoju podršku i simpatije u toku ovih istraživanja.

Na kraju želim da se zahvalim svojoj porodici, naročito svojim roditeljima, na bezgraničnoj ljubavi, strpljenju i podršci, koju mi nesebično pružaju.

Zahvalan sam na finansijskoj pomoći pruženoj od strane sledećih ljudi, institucija i organizacija:

- **Izvršnom vijeću AP Vojvodine;**
- **Ministarstvu prosvjete i nauke Republike Crne Gore;**
- **Skupštini opštine Bijelo Polje;**
- **Direktoru Srednje stručne škole g–dinu Božidaru Ljujiću.**

Novi Sad, 07.12.2009.

Dušan Bugarin

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Cilj rada	4
3. Opšti dio	6
3.1. <i>Myrtus communis</i> L.-mirta, mrča	7
3.2. Hemijski sastav vrste <i>Myrtus communis</i> L.	8
3.2.1. Etarska ulja	8
3.2.1.1. Farmakološko djelovanje etarskih ulja	12
3.2.2. Fenolna jedinjenja biljaka	13
3.2.2.1. Farmakološko djelovanje biljnih fenola	15
3.2.3. Farmakološko djelovanje <i>Myrtus communis</i> L.	18
3.3. Slobodni radikali i antioksidanta aktivnost	19
3.3.1. Slobodni radikali i oksidativni stres	19
3.3.2. Antioksidanti i antioksidantni sistemi	24
3.4. Antibakterijsko djelovanje	27
3.4.1. Patogeni mikroorganizmi i njima uzrokovane bolesti	27
3.4.2. Biljni antimikrobni agensi	32
3.5. Mutagenaza i antimutagena aktivnost	34
3.5.1. Antimutageno djelovanje biljnih terpenoidnih i fenolnih jedinjenja	38
4. Eksperimentalni dio	42
4.1. Materijal	43
4.1.1. Biljni materijal	43
4.1.2. Supstance i reagensi	43
4.1.3. Bakterijski sojevi	44
4.1.4. Hranljive podloge	44
4.2. Metode	45
4.2.1. Primijenjene tehnike u fitohemijskim ispitivanjima	45
4.2.1.1. Izolacija etarskog ulja – metodom hidrodestilacije (HD)	45
4.2.1.2. Pripremanje ekstrakata metodom maceriranja	46
4.2.1.3. UV/VIS spektrofotometrija	46
4.2.1.4. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida	46
4.2.1.5. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS)	47
4.2.1.6. Visokoefikasna tečna hromatografska (HPLC-DAD) analiza	48
4.2.2. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti	49
4.2.2.1. Određivanje DPPH [•] radikala	49
4.2.2.2. TLC-DPPH test	50
4.2.2.3. Određivanje hidroksil radikala (OH [•])	51
4.2.2.4. Inhibicija azot (II) oksida (NO [•])	51
4.2.2.5. Određivanje superoksid anjon radikala (O ₂ ⁻)	52
4.2.2.6. Inhibicija enzima ksantin-oksidade (XOD)	52
4.2.2.7. Određivanje lipidne peroksidacije (LP)	53
4.2.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	54

4.2.3.1. Oživljavanje liofiliziranih sojeva	54
4.2.3.2. Pripremanje prekonoćne kulture	54
4.2.3.3. "Disk diffusion" test	54
4.2.3.4. Mc Farland standardi	55
4.2.3.5. Standardizacija inokuluma	55
4.2.3.6. Diluciona metoda	56
4.2.4. Metode primjenjene u ispitivanju antimutagene aktivnosti	57
4.2.4.1. Određivanje toksičnog efekta ispitivanih supstanci	57
4.2.4.2. "Spot" test	57
4.2.4.3. Određivanje antimutagenog efekta na spontanu i t-BOOH indukovanu mutagenezu u <i>E. coli</i> IC202	57
4.2.4.3. Provjera broja pre-egzistirajućih mutanata	58
4.2.4.4. Izračunavanje procenta antimutageneze	58
4.2.4.5. Procjena antimutagenog efekta	59
4.3. Statistička obrada podataka	59
5. Rezultati i diskusija	60
5.1. Hemijski sastav etarskih ulja <i>Myrtus communis</i> L.	61
5.1.1. Određivanje količine ukupnog etarskog ulja	61
5.1.2. Hemijski skrining etarskog ulja primjenom TLC (Thin Layer Chromatography) tehnike	62
5.1.3. Kvalitativni i kvantitativni sastav etarskog ulja mirte	63
5.2. Hemijski sastav metanolnih ekstrakata <i>Myrtus communis</i> L.	76
5.2.1. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u metanolnim ekstraktima mirte	76
5.2.2. Dvodimenzionalna TLC (2D-TLC) analiza hemijskog sastava metanolnih ekstrakata <i>Myrtus communis</i> L.	78
5.2.3. HPLC-DAD analiza metanolnih ekstrakata <i>Myrtus communis</i> L.	79
5.3. Antioksidantne aktivnosti <i>Myrtus communis</i> L.	84
5.3.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti etarskog ulja <i>Myrtus communis</i> L.	84
5.3.2. Antioksidantne aktivnosti metanolnih ekstrakata <i>Myrtus communis</i> L.	87
5.3.2.1. Određivanje neutralizacije DPPH [•] radikala	87
5.3.2.2. Određivanje neutralizacije hidroksil radikala (OH [•])	88
5.3.2.3. Neutralizacija azot (II) oksida (NO [•])	89
5.3.2.4. Neutralizacija superoksid anjon radikala (O ₂ ^{•-})	90
5.3.2.5. Inhibicija enzima ksantin-oksidade	91
5.3.2.6. Određivanje uticaja metanolnih ekstrakata mirte na lipidnu peroksidaciju (LP)	92
5.3.2.7. Određivanje ukupnog redukcionog potencijala metanolnih ekstrakata <i>Myrtus communis</i> L. (FRAP)	93
5.4. Antibakterijska aktivnost ispitivanih etarskih ulja i	95

ekstrakata <i>Myrtus communis</i> L.	
5.4.1. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja <i>Myrtus communis</i> L.	95
5.4.1.1. "Disk difuzioni" test	95
5.4.1.2. MIC test	98
5.4.2. Antibakterijska aktivnost metanolnih ekstrakata <i>Myrtus communis</i> L.	100
5.4.2.1. "Disk diffusion" test	100
5.4.2.2. MIC test	102
5.5. Antimutagena aktivnost <i>Myrtus communis</i> L.	104
5.5.1. Antimutagena aktivnost etarskih ulja <i>Myrtus communis</i> L.	104
5.5.2. Antimutagena aktivnost ekstrakata <i>Myrtus communis</i> L.	107
6. Zaključak	111
7. Literatura	118
8. Prilog	136
9. Skraćenice	172
10. Biografija	176

1. Uvod

Nema stvari koja je bila tako vredna proučavanja kao priroda

N. Tesla

Čovjekova spoznaja ljekovitih svojstava biljaka, kreće sa razvojem prvih ljudskih civilizacija. Upotreba biljaka u liječenju vodi porijeklo iz daleke prošlosti. Vještina liječenjem biljem razvila se kod svih naroda i sačuvala se, negdje više, negdje manje, kao tradicionalna ili narodna terapija sve do danas. Mnoge biljke koje su se uspješno vijekovima upotrebljavale u tradicionalnoj terapiji, prihvaćene su i u medicini i predstavljaju važne ljekovite sirovine (Lukić, 1993). Vještina liječenja kod drevnih naroda bila je povezana sa religijskim i ritualnim obredima, što se i danas sreće tamo gdje su očuvni tradicionalni oblici ljudske zajednice (Knežević, 2004). Podatke o korišćenju ljekovitog bilja u drevnoj prošlosti moguće je saznati iz etnografskih i arheoloških izvora i pisanih spisa. Najstariji takvi izvori o korišćenju bilja sreću se kod Kineza (Šen-Nung, 2737-2698 god. p.n.e.), Indusa (Vede, 2000-1000 god. p.n.e.), takođe, zapisi sa sumerskih tablica iz trećeg milenijuma p.n.e. govore o značaju koji su zauzimale aromatične biljke kao začini u ljudskoj ishrani, ali i kao ljekovite biljke, koje su prvenstveno korištene kao digestivi i tonici (Mišan, 2009). Posebno su važne glinene tablice otkrivene u Asiriji, koje sadrže podatke o ljekovitom bilju, gdje se osim opisa raznih ljekovitih biljnih vrsta, govori i o terapijskoj primjeni kao i galenskoj formi u kojoj se biljka upotrebljava. Podatke o upotrebi ljekovitog bilja Asirci su prevashodno preuzeli od Sumera i Vavilonaca. U tim drevnim vremenima se pominju: ricinus, vrba, vinova loza, lokvanj, kafa i mnoge druge biljke. Osnivačem evropske farmakognozije, smatra se starorimski ljekar, grčkog porijekla, *Pedanius Dioscorides* (I vijek, n.e.) (www.wikipedia.org). Procjenjuje se da, čak i u današnje vrijeme, oko 60% ukupne svjetske populacije se oslanja na upotrebu ljekovitog bilja u profilaksi i terapiji različitih oboljenja, te su stoga prirodni proizvodi veoma poznati kao značajan izvor lijekova (Harvey, 2000). Posebno mjesto među njima zauzimaju aromatične biljke čija je upotreba u fitoterapiji opravdana u velikoj mjeri zahvaljujući biološkim funkcijama sekundarnih metabolita kao što su terpenoidi (Božin, 2009). Među jedinjenjima iz ove grupe posebno se ističu isparljiva jedinjenja iz klase mono-

seskviterpena. Najnovija istraživanja iz oblasti hemije, biohemije i medicine pokazuju da aromatične ljekovite biljke sadrže čitav niz strukturno divergentnih sekundarnih biomolekula koji pokazuju: antibakterijska, antifungalna, antiinflamatorna, antialergijska, antimutagena, hepatoprotekorna kao i snažna antioksidantna svojstva (Chun-Mao Lin et al., 2002; Gündüz et al., 2008). Dokazano je da pojedine supstance aromatičnih biljaka pokazuju značajnu antitumorsku aktivnost inhibicijom aktivnosti HMG-CoA reduktaze (Crowell et al, 1996). Pored navedenog, aromatične biljke predstavljaju značajnu sirovinu za izolovanje etarskih ulja, koja se primjenjuju u različitim industrijskim granama, a pogotovo u savremenoj kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Kujundžić, 2002).

Danas su veoma intenzivna izučavanja antioksidantnih aktivnosti aromatičnih biljaka i njihovih ekstrakata. Naime, savremena biohemijska i biomedicinska istraživanja nedvosmisleno su dokazala da je nekontrolisana produkcija slobodnih radikala u humanom organizmu uzrok brojnih patoloških stanja kao što su: starenje, kancerogeneza, kardiovaskularna, neurološka oboljenja itd (Halliwell i Gutteridge, 1999). Poznato je da oksidacioni stres može dovesti i do karakterističnih mutacija koje mogu inicirati različite patološke procese u organizmu (De Flora et al., 2005).

Pored toga oksidativni procesi uzok su i promjene kvaliteta hrane kao i raznih prehrambenih i kozmetičkih proizvoda. Zbog toga se u industriji hrane i kozmetičkih preparata sve više koriste antioksidanti-jedinjenja koja na različite načine sprječavaju ili usporavaju oksidacione procese. Međutim dokazano je da neki sintetski antioksidansi kao što su 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT), (1,1-dimetiletil)-4-metoksifenol (BHA) i propilgalat (PG) u određenim koncentracijama i uslovima mogu djelovati kao mutageni i dovesti do razvoja kancerogenih procesa (Namiki, 1990).

Brojna istraživanja pokazuju da su aromatične biljke nepresušan izvor biološki aktivnih jedinjenja koja imaju sposobnost da inhibiraju štetne oksidacione procese kako u živoj ćeliji tako i u različitim neživim biološkim sistemima i supstratima. Pored toga od davnina je poznato da etarska ulja aromatičnih biljaka djeluju kao snažni antimikrobni agensi te se uspješno mogu koristiti za sprječavanje kvarenja različitih proizvoda (Mimica-Dukić i Božin, 2008).

Mirta (*Myrtus communis* L.) je aromatična biljka široko rasprostranjena u mediteranskom pojasu. Iako je od davnina prisutna u tradicionalnoj medicini lokalnog stanovništva, u našoj zemlji nije dovoljno ispitivana.

Polazeći od hipoteze da bi s obzirom na prisustvo jedinjenja fenolnih i terpenskih struktura ova biljka mogla biti značajan prirodni resurs biološki aktivnih jedinjenja, preduzeta su detaljna hemijska, biohemijska i biološka istraživanja vrste *Myrtus communis* L., sa ciljem da se utvrdi značaj ove biljne vrste, kao komercijalno isplative sirovine za prehrambenu, farmaceutsku i kozmetičku industriju.

2. Cilj rada

1) Hemijska karakterizacija vrste *Myrtus communis* L.

Preliminarna hemijska ispitivanja samonikle vrste *Myrtus communis* L. sakupljene na šest lokaliteta u Crnoj Gori (Ulcinj, Bar, Budva, Tivat, Kotor i Herceg Novi):

- analiza kvalitativnog i kvantitativnog sastava pojedinih klasa fenolnih jedinjenja,
- ispitivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava isparljivih jedinjenja-etarskih ulja.

2) Ispitivanje biohemijskih aktivnosti ekstrakata vrste *Myrtus communis* L.:

- *in vitro* ispitivanje antioksidantnog djelovanja na određene kratko- i dugo živeće slobodne radikale (DPPH, OH, NO i O²⁻) kao i uticaj na lipidnu peroksidaciju i inhibiciju enzima ksantin-oksidade,
- određivanje ukupnog redukcionog potencijala ispitivanih ekstrakata (FRAP).

3) Biološka ispitivanja ekstrakata vrste *Myrtus communis* L.:

- ispitivanje antibakterijskog djelovanja na odabrane ATCC bakterijske sojeve,
- određivanje antimutagenog efekta na spontanu i t-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202.

3. Opšti dio

3.1. *Myrtus communis* L.-mirta, mrča

Vrsta *Myrtus communis* L., pripada porodici *Myrtaceae*. Ova porodica obuhvata 130 rodova i preko 3000 vrsta rasprostranjenih u tropskim i suptropskim predjelima. To su najčešće zimzelene, drvenaste vrste koje u raznim organima, najčešće u listu i kori sadrže veće ili manje količine etarskog ulja. Listovi su naspramni, rijetko naizmjenični, zimzeleni, kožasti, cijeli sa vrlo sitnim stipulama. Cvjetovi su pretežno složeni u metličaste, rijetko u grozdaste ili dihidazijalne cvasti. Rod *Myrtus* obuhvata oko 60 vrsta. U Evropi raste samo jedan predstavnik ovog roda *Myrtus communis* L., koji je sastavni dio makije. Ime roda potiče od grčke riječi *myrein* = bujati, ili *myron* = balzam, jer listovi i plodovi mirišu (Jovanović, 1991). Mirta potiče sa Istoka, a u mediteranske zemlje prenijeta je još u praistorijsko doba (Grlić, 1986). U Crnoj Gori raste na primorju kao samonikla biljka.

Vrsta *Myrtus communis* L. je veoma varijabilna. U okviru vrste *Myrtus communis* L. opisane su dvije podvrste *Myrtus communis* L. ssp. *tarantena* i *Myrtus communis* L. ssp. *archangeli*. Mirta je razgranati zimzeleni žbun sa gustim, zbijenim i uspravnim stabljikama. Podvrsta *tarantena* dostiže visinu do 5 m, dok podvrsta *archangeli* čak i do 20 m. Mirta raste u sredozemlju kao sastavni dio zimzelenih šuma i makije. Karakteristično za makiju, čiji je mirta obavezni konstituent, je to da je izgrađuje sekundarna vegetacija koja je nastala uglavnom antropogenom degradacijom primarne vegetacije. Takođe, se može naći i u šumama alepskog bora. Listovi kod mirte su naspramni, kožasti, jednostavni, cijelog oboda, usko-jajasti ka vrhu suženi, 1 do 2 cm dugi i od 0,5 do 1 cm široki, odaju jak miris. Listovi su odozgo tamnozeleni, dok su sa naličja svjetliji. Kora je svijetla, crvenkasta, kasnije pepeljasto-siva. Biljka cvjeta tokom jula i avgusta, cvjetovi su usamljeni u pazuhu listova, bijeli na drškama sa pet latica i mnogo prašnika, aktinomorfni, hermafroditni, mirišljavi. Plod je okruglasta ili ovalna bobica promjera 5-7 mm i obavijena čašicom (Jovanović, 1991) (slika 3.1.). Kad sazriju, u novembru, postaju mesnate, sočne i plavkasto-crvene, a u njima je mnoštvo bubrežastih sjemenki (Grlić, 1986).

Iz gore navedenog može se zaključiti da mirta ima izrazito kseromorfnu građu. Iz svježih listova se hidro-destilacijom dobija mirtino ulje. Etarskog ulja ima i u cvjetovima i plodovima, ali znatno manje u odnosu na lišće.



Slika 3.1. *Myrtus communis* L. u cvijetu i sa plodovima

Prema podacima iz literature procenat etarskog ulja se kreće: u listovima oko 0,8%, u cvijetu oko 0,4%, u nezrelim plodovima oko 0,5%, dok u zrelih plodovima svega oko 0,02% (Gauthier et al., 1988; Boelenes i Jimenez, 1991; Garry i Chalchat, 1992).

3.2. Hemijski sastav vrste *Myrtus communis* L.

3.2.1. Etarska ulja

Etarska ulja predstavljaju specifične, najčešće tečne produkte biljnog tkiva. To su sekundarni biljni metaboliti definisani kao mješavine lipofilnih, tečnih, mirisnih i isparljivih komponenti prisutnih uglavnom u višim biljkama. Do sad je opisano više od 3000 komponenata etarskih ulja (Kohlert et al., 2000). Sve ove komponente svrstane su u 5 klasa:

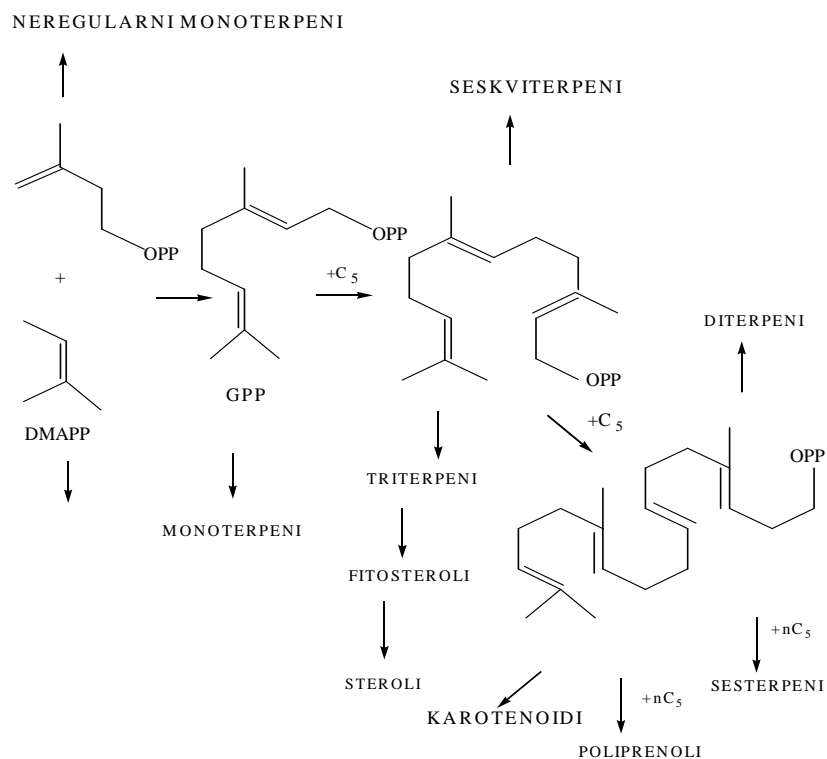
- terpenoidi,
- alifatične isparljive komponente (dugolančani ugljovodonici i njihovi oksidativni derivati), odgovorne za takozvane voćne mirise,

- aromatične isparljive komponente (derivati benzojeve kiseline, fenilpropanoidi i kumarini) veoma intenzivnog mirisa,
- supstance koje sadrže azot (indolski derivati, alifatični amini), neprijatnog mirisa na ribu,
- supstance koje sadrže sumpor (izosulfocijanati i organski disulfidi), nosioci jakih, neprijatnih mirisa.

Terpenoidi, predstavljaju najbrojniju grupu sekundarnih metabolita biljaka. U etarskim uljima su zastupljene dvije klase terpenoida: monoterpeni (C-10), (regularni, isparljivi) i seskviterpeni (C-15). Monoterpeni se javljaju u obliku acikličnih (linearnih), mono- i bicikličnih, alifatičnih i aromatičnih struktura. U okviru frakcije seskviterpena, formirane su još raznovrsnije strukture osnovnog skeleta, a zbog dužine lanca C-atoma veća je mogućnost različitih ciklizacija. Obje klase, u zavisnosti od uvedenih funkcionalnih grupa, mogu se javiti u obliku: ugljovodonika, alkohola, fenola, ketona, oksida, estara. Do sada je u etarskim uljima identifikovano nekoliko stotina monoterpena, i nekoliko hiljada seskviterpena. Monoterpeni možemo predstaviti sa tridesetak, dok seskviterpeni sa preko 200 osnovnih struktura (Devon i Scott, 1972). Na sobnoj temperaturi, etarska ulja su lako pokretljive, bezbojne ili slabo obojene, bistre tečnosti, ređe imaju viskoznu ili polučvrstu konzistenciju. Već na nižim temperaturama, pojedini sastojci etarskih ulja isparavaju i zato imaju specifičan, prijatan ili neprijatan miris. Etarska ulja su smješe različitih jedinjenja, tako da ona frakciono ključaju u intervalu od 150-350°C.

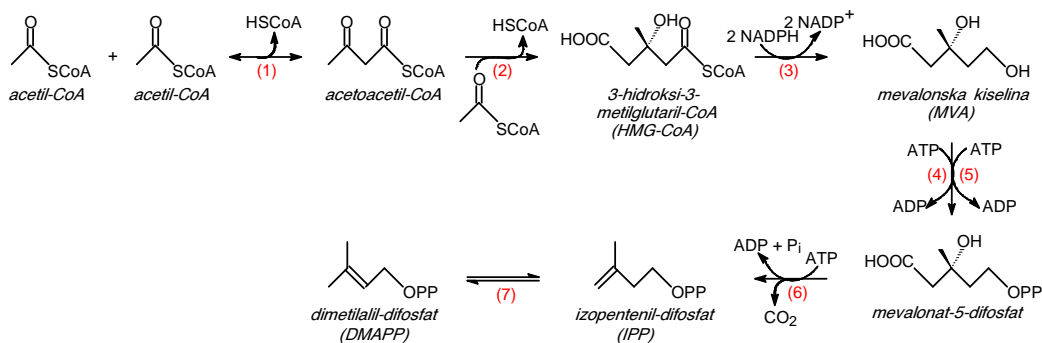
Biljke koje sadrže etarska ulja nazivaju se aromatične. Ove biljke su zastupljene u preko 50 familija, a najpoznatije su aromatične biljke iz familija: *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae* i *Laureaceae*. Etarska ulja su lokalizovana u različitim dijelovima biljaka. Interesantno je da etarska ulja lokalizovana u različitim dijelovima iste biljke, mogu biti sličnog sastava, ali se mogu i značajno razlikovati (npr. etarsko ulje zrelog i zelenog ploda). Inače, aromatične biljke sadrže najčešće manje od 1% ulja. Ove mirisne tečnosti nastaju u biljkama aktivnošću endogenih i egzogenih sekretornih tkiva.

Biosinteza osnovnih klasa terpenoida odvija se prema tzv. "biogenetskom pravilu" koje je ustanovio Ružička (1953. god.), što sugerise da se sve klase izoprenoida sintetizuju iz biohemijski "aktivnog izoprena" (slika 3.2.). Biohemijski aktivne izoprenske jedinice se identifikuju kao piro-fosfatni (difosfatni) estri i to kao dimetilalil pirofosfat (DMAPP) i izopentenil pirofosfat (IPP)



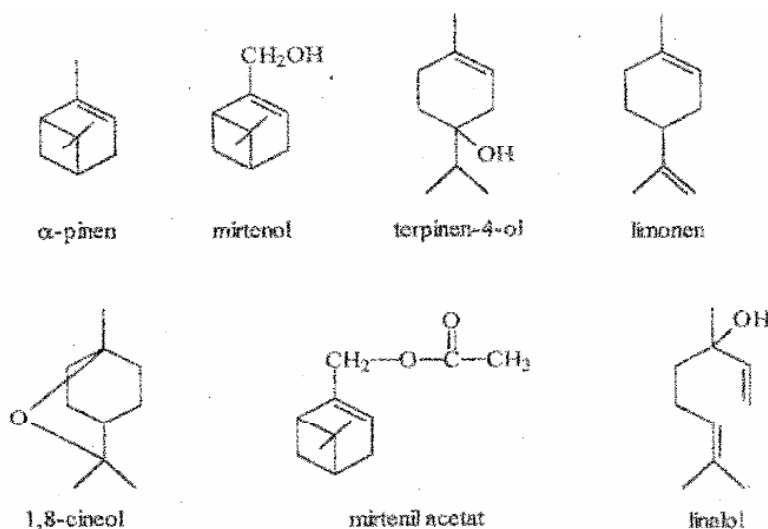
Slika 3.2. Biogenetsko izoprensko pravilo (Ružička, 1953)

Različite klase izoprenoida, iz iste izoprenske jedinice, nastaju pomoću različitih kondenzacija, ciklizacija, intramolekulskih premještanja ili adicija. Acetat-mevalonatni put (slika 3.3.) je dugo smatran za jedini biosintetički put u svim organizmima za biosintezu IPP (Mimica-Dukić, 1995).



Slika 3.3. Acetat-mevalonatni put za biosintezu izopentenil-difosfata (IPP) i dimetilalil-difosfata (DMAPP). Odgovarajući enzimi su: (1) β -ketoacil-tiolaza; (2) HMG-CoA-sintetaza; (3) HMG-CoA-reduktaza; (4) mevalonat-kinaza; (5) fosfo-mevalonat-kinaza; (6) difosfat-mevalonat-dekarboksilaza; (7) izopentenil-difosfat-izomeraza

Etarsko ulje mirte prisutno je u listu, cvijetu i plodu. Istraživanja sastava etarskog ulja mirte pokazala su da su najzastupljenije komponente iz klase monoterpena i to: **α -pinen**, **1,8-cineol**, **mirtenol**, **mirtenilacetat**, **terpinen-4-ol**, **limonen**, **linalol**, (Gauthier et al., 1988; Boelenes i Jimenez, 1991; Garry i Chalchat, 1992) čije su strukture date na slici 3.4.



Slika 3.4. Dominantni monoterpeni u etarskom ulju mirte

Utvrđeno je da sastav etarskog ulja zavisi od geografskog porijekla biljke (Lawrence, 1997). Dominantna komponenta etarskog ulja mirte je **1,8-cineol**, čija se količina kreće 19–45%. Neki autori (Boelenes i Jimenez, 1991), izdvajaju dva hemijska tipa mirte u zavisnosti od količine prisustnog **mirtenil acetata** (minimum 1%). Tako se na primjer, ulje iz Španije (Boelenes i Jimenez, 1991), karakteriše visokim sadržajem **mirtenil acetata** (35,9%), a malom količinom **α -pinena**, dok npr. ulje mirte iz Maroka (Gauthier et al., 1988; Boelenes i Jimenez, 1991; Garry i Chalchat, 1992), Portugala (Frazao, 1974; Boelenes i Jimenez, 1991), Francuske (Gauthier et al., 1988), Albanije (Boelenes i Jimenez, 1991), i bivše Jugoslavije (Garry i Chalchat, 1992), sadrži veće količine **α -pinena** (18,5-24,8%) i **mirtenil acetata**.

U drugu grupu ubrajaju se ulja porijeklom iz Libana (Garry i Chalchat, 1992), i Irana (Weyerstahl, 1994) koja sadrže slične količine **α -pinena** i **1,8-cineola**, dok se npr. etarsko ulje porijeklom iz Tunisa (Garry i Chalchat, 1992), i Sardinije (Tateo i Picci, 1982), karakteriše izuzetno visokim sadržajem **α -pinena**, koga ima dvostruko više od

1,8-cineola. S druge strane, etarska ulja porijeklom iz Grčke (Gautheier et al., 1988), Kalifornije (Lawrence, 1997) i Rusije (Lawrence, 1997), se karakterišu visokim sadržajem **linalola** i **limonena**.

3.2.1.1. Farmakološko djelovanje etarskih ulja

Aktivnost etarskih ulja predstavlja mješavinu aktivnosti njegovih sastojaka. Međutim, teško je ispitivati aktivnost pojedinačnih komponenti ulja zbog sinergističkog djelovanja njegovih komponenti i uglavnom se definiše farmakološka aktivnost ukupnog etarskog ulja. Pored velike raznovrsnosti, moguće je izdvojiti nekoliko dejstava koje ispoljava veći broj etarskih ulja. Zbog snažnog antimikrobnog djelovanja (Chaumont i Leger, 1992; Panizzi et al., 1993; Pattnaik et al., 1997; Reddy et al., 1998; Rusenova i Parvanov, 2009; Oussalah et al., 2007; Inouye et al., 2001; Mimica-Dukić et al., 2004; Božin et al., 2007) isparljive komponente etarskih ulja pokazale su se veoma prikladnim za inhalaciju pri tretmanu infekcija respiratornog trakta. Mnoga etarska ulja se zbog svoje spazmolitičke aktivnosti koriste za opuštanje spazma glatke muskulature organa digestivnog trakta, a pored toga dokazano je da stimulišu lučenje enzima u ovim organima i poboljšavaju proces varenja hrane (Sadraei, 2009). Ovakvom aktivnošću etarskih ulja na glatku muskulaturu mogu se objasniti pozitivni efekti primjene istih kao blagih sedativa, relaksirajućih sredstava i sredstava za otklanjanje nesanice (Hills i Aronson, 1991). Kada se aplikuju na kožu ili sluznicu etarska ulja pokazuju rubefacijentni efekat, pa se primjenjuju u terapiji oboljenja s bolovima u perifernim mišićnim tkivima (Ayoola et al., 2008). Iritantnim djelovanjem na sluznicu bronhija, odnosno pojačanom aktivnošću njihovog cilijarnog epitela objašnjava se ekspektorantno djelovanje pojedinih etarskih ulja (Crowell et al., 1996). Takođe, lokalnom iritacijom bubrežnih tubula, objašnjava se diuretičko djelovanje etarskih ulja (Stanić i Samardžija, 2006). Mirisne komponente etarskih ulja stimulišu olfaktorne receptore sluzokože nosa, inicirajući nervne impulse koji dovode do niza sekundarnih efekata kao što su: aktivacija respiratornih organa, stimulacija rada srca i cirkulacije, opuštanje glatke muskulature (Hills i Aronson, 1991; Buchbauer i Irovetz, 1994; Tyler, 1994; Bruneton, 1999). Za pojedine komponente etarskog ulja (β -jonon, geraniol, perililalkohol, δ -limonen) dokazano je da mogu djelovati kao snažni terapeutici u liječenju ili inhibiciji rasta tumora (Yu et al., 1995; Crowell et al., 1996; Karlson et al., 1996; Bezerra et al., 2009). Treba

naglasiti i da pojedina etarska ulja predstavljaju i oficinalne droge mnogih farmakopeja (Ph. Jug. V, 2000; Eur. Ph. IV, 2002).

Rijetko je primijećeno da etarska ulja ispoljavaju hroničnu toksičnost. Malo je podataka o eventualnom mutagenom, teratogenom i kancerogenom djelovanju etarskih ulja, odnosno pojedinih komponenti etarskih ulja. Međutim, pojedine komponente u većim količinama mogu ispoljiti toksično dejstvo. Tako tujon i pinokamfon pored lokalnih oštećenja sluznice mogu dovesti do epileptičnih napada, i izazvati psihičke poremećaje (www. wikipedia.org). Teorijski postoji mogućnost da mentol ili kamfor prouzrokuju grčenje jednjaka, hipersalivaciju, hiperfleksiju i hipotoniju (Torii et al, 1988; Schaller i Korting, 1995; Blumenthal, 1999). Sve ovo ukazuje na potrebu da se izolovana etarska ulja moraju pažljivo primjenjivati, naročito u aromoterapiji, danas veoma popularnom načinu liječenja, ali i prilikom drugih primjena.

3.2.2. Fenolna jedinjenja biljaka

Druga značajna klasa sekundarnih biomolekula mirte su fenolna jedinjenja. Ova klasa jedinjenja obuhvata širok spektar supstanci koje kao zajedničku karakteristiku imaju aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Biljni fenoli su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti biljaka i do danas ih je identifikovano više hiljada, u slobodnom obliku ili češće u obliku glikozida (Leucuta et al., 2005). Monosaharidi koji najčešće ulaze u sastav glikozida su: glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoz, glukuronska i galakturonska kiselina, pored toga šećeri mogu biti prisutni u obliku: mono-, di-, tri-, ili tetra-saharida.

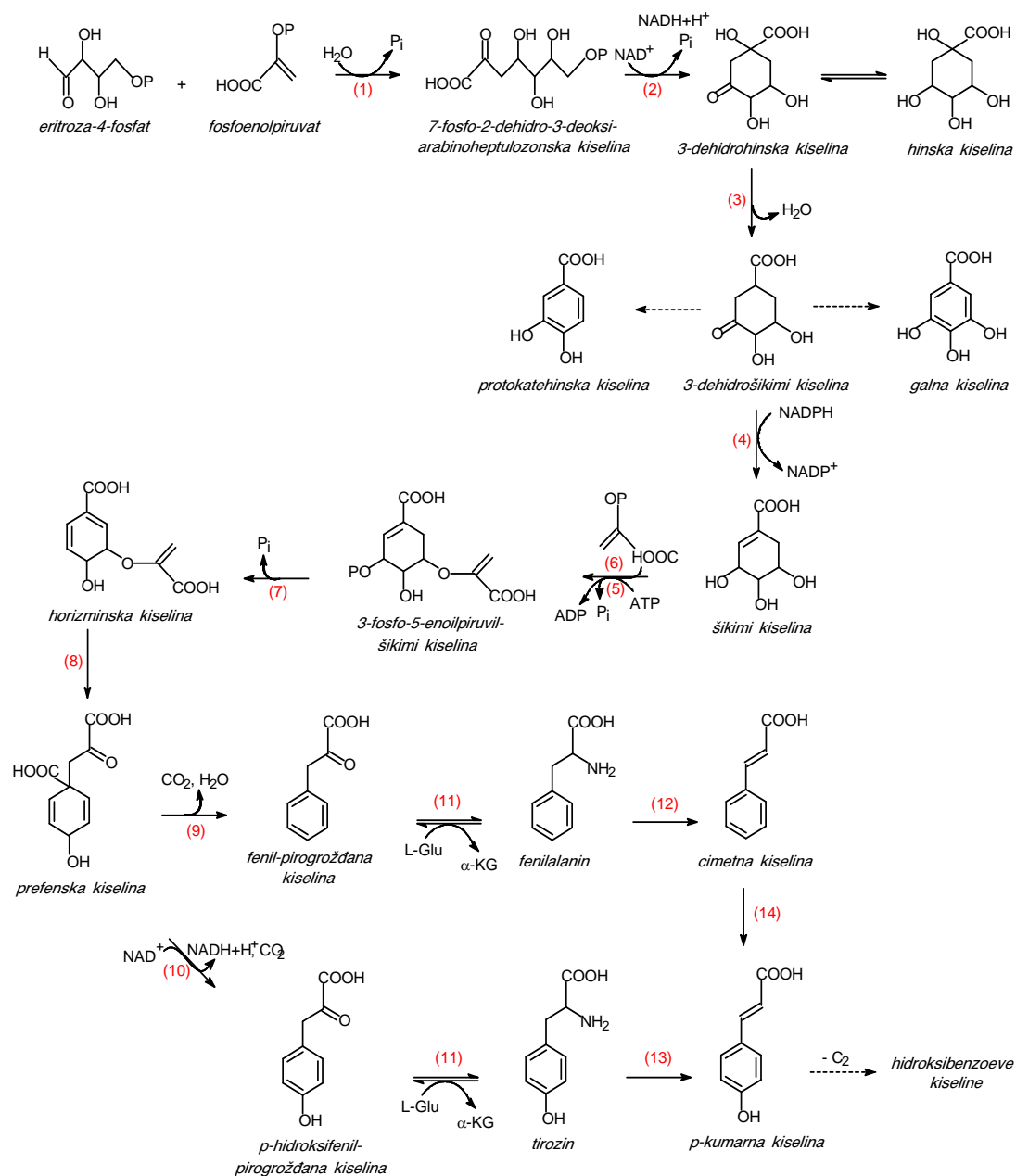
U literaturi se mogu naći različite klasifikacije fenolnih jedinjenja od kojih je najčešća klasifikacija koja se zasniva na broju ugljenikovih atoma vezanih za osnovni skelet fenola.

U prirodi postoje tri različita biogenetska puta nastajanja biljnih fenola:

- šikimat-arogenat put
- acetat-malonat put (poliketidni)
- mješoviti biosintetski put

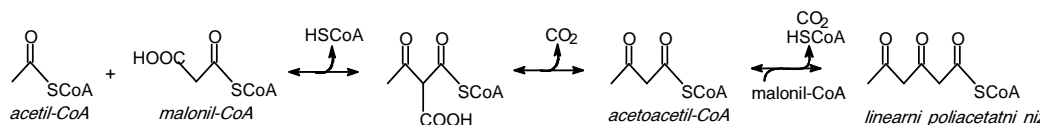
Šikimat–arogenat put počinje reakcijom fosfoenol-piruvata (PEP) i D-eritrozo-4-fosfata u kojoj nastaje 3-deoksi-D-arabino-7-fosfo-heptulozonska kiselina, a od nje nizom

veoma složenih hemijskih reakcija nastaje šikimska kiselina kao centralni prekursor u ovom biosintetskom putu (Popović, 2001) (slika 3.5.).



Slika 3.5. Fenilpropanoidni biosintetski put. Odgovarajući enzimi su: (1) enzimski kompleks; (2) 3-dehidrohinat-sintetaza; (3) 3-dehidrohinat-dehidrataza; (4) šikimat-dehidroganeza; (5) šikimat-kinaza; (6) 3-fosfošikimat-1-karboksivinil-transferaza (EPSP-sintetaza); (7) horizmat-sintetaza; (8) horizmat-mutaza; (9) prefenat-dehidrataza; (10) prefenat-dehidrogenaza; (11) tirozin-transaminaza; (12) fenilalanil-amino-liaza (PLA); (13) tirozin-amino-liaza (TAL); (14) cinamat-4-hidroksilaza (C4H).

Acetat-malonat put nastanka fenolnih jedinjenja, započinje kondenzacijom acetatnih jedinica u poliketidni lanac koji je izgrađen od naizmjeničnih keto- i metilenskih grupa (slika 3.6.).

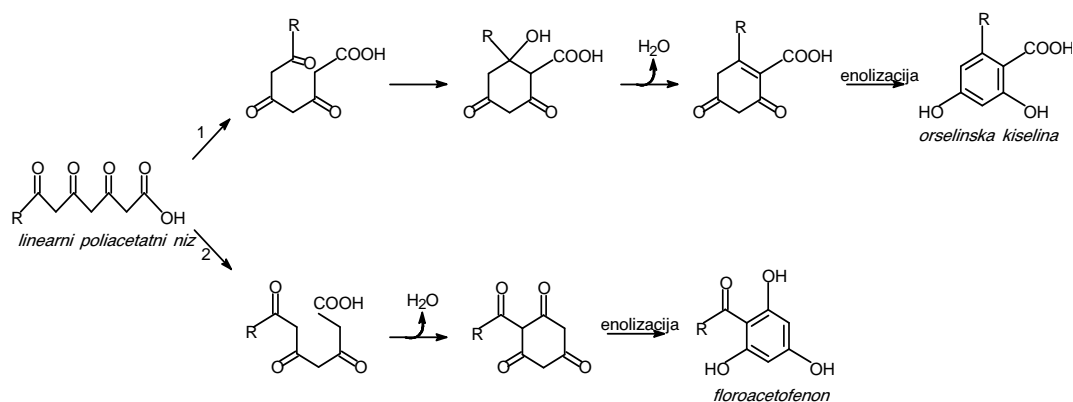


Slika 3.6. Formiranje linearnog poliacetatnog niza

Ovako nastali linearni poliacetatni lanci mogu se ciklizovati na dva načina:

- mehanizmom intramolekulske aldolne kondenzacije
- mehanizmom Klajsen-ove kondenzacije,

pri čemu se stvaraju različita fenolna jedinjenja (slika 3.7).



Slika 3.7. Biosinteza fenolnih jedinjenja preko poliacetatnog puta

3.2.2.1. Farmakološko djelovanje biljnih fenola

Dokazano je da fenolni sekundarni metaboliti biljaka pokazuju širok spektar farmakoloških aktivnosti. Potvrđeno je da fenolne kiseline inhibiraju određene enzimske sisteme, od kojih je najznačajnije djelovanje na lipidnu peroksidazu pa se zbog inhibicije ovog enzima mogu koristiti kao konzervansi, antiinflamatorni agensi i kao antioksidanti što otvara brojne mogućnosti za proširenje njihove terapijske primjene (Ercisli et al., 2008). U literaturi postoji dosta podataka koji potvrđuju antimikrobnu, antioksidativnu,

hepatoprotektornu, antiinflamatornu, vazoprotektornu i citostatsku aktivnosti ovih jedinjenja (Shukla et al., 1992; Takasaki et al., 1995; Tandon et al., 1995; Soon-Ok Oh et al., 2008; Mimica-Dukić i Božin, 2008). Galna kiselina pokazala se kao snažan inhibitor produkcije antitijela i formiranja klona (Soon-Ok Oh et al., 2008). Interesantno je da elagna kiselina neutrališe štetno dejstvo benzopirena tj., inhibira njegovu mutagenost i citotoksičnost. Takođe je dokazano da su glikozidni estri kafene kiseline inhibitori 5-lipooksigenazne aktivnosti u metabolizmu arahidonske kiseline i sinteze leukotriena, te se smatra da se mogu koristiti kao potencijalni antialergeni ili antiinflamatorni agensi (Harborne, 1989). Farmakološka ispitivanja fenolnih jedinjenja vrste *Mentha longifolia* L. potvrdila su spazmolitičku i holeretičku aktivnost koja se pripisuje prisustvu fenolnih kiselina (Mimica-Dukić et al., 1996).

Potvrđeno je da kumarini smanjuju permeabilnost zidova kapilara i limfnih sudova pa se koriste kod inflamatornih procesa, kao i za smanjenje eskudacija i edema (Tandon et al., 1995). Neki kumarini intenziviraju glomerularnu filtraciju i djeluju kao diuretici. Kumarini su fotosenzibilizatori (povećavaju broj melanocita i pospješuju sintezu pigmenta) pa se koriste u terapiji vitiliga i psorijaze. Takođe se koriste u liječenju katarakte jer su odgovorni za inhibiciju aldoza reduktaze. Visnadin blokira kalcijumove kanale i pojačava koronarnu vazodilataciju dok furanokumarinski derivati djeluju kao nespecifični bronhodilatatori (Tandon et al., 1995). Kelin i visnagin djeluju kao spazmolitici, čak i pri minimalnim koncentracijama. Pomenuti kumarini koriste se u terapiji: angine pektoris, srčane insuficijencije, tahikardije, ekstrasistola i dr. U laboratorijskim uslovima utvrđena je mutagena aktivnost linearnih furanokumarina koja se ostvaruje njihovim povezivanjem sa pirimidinskim bazama u lancu DNK (Cook i Samman, 1996). Ovakva aktivnost se može potencijalno iskoristiti u terapiji kancera. Dokazano je da se primjenom kumarina mogu aktivirati makrofagi i kao takvi penetrirati u tumorsko tkivo gdje neutrališu maligne ćelije (Murray, 2005). Herniarin, eskuletin, skopolin i skopoletin pokazali su antiinflamatornu aktivnost inhibirajući otpuštanje eikosanoida iz jonofora stimulisanih makrofaga miša (Laposata et al., 2007). Antimutagenu aktivnost posjeduju i kumarin i umbeliferon. Međutim, pored svih pomenutih pozitivnih efekata ne treba zaboraviti na toksične efekte određenih kumarina kao što su akutna hepatotoksičnost i kancerogenost alfatoksina (Murray, 2005).

Flavonoidi su jedinjenja sa izrazito širokim dijapazonom farmakoloških aktivnosti, kao što su: antimikrobna, antioksidantna, antimutagena, hepatoprotektorna, antialergijska,

antiinflamatorna, antivirusna, antikancerogena kao i sposobnost inhibicije određenih enzima (Cook i Samman, 1996).

Flavonoidi smanjuju krstost i permeabilnost, a povećavaju elastičnost i osnovni tonus zida kapilara, pa se koriste u terapiji hemoragija, dijabetesa, hipertenzije i ateroskleroze (Kujundžić, 2002). Ovo se objašnjava time da flavonoidi kao donori protona, sprječavaju redukciju dehidroaskorbinske kiseline ili da inhibiraju određene enzime (hijaluronidazu, elastazu i katehol-O-metiltransferazu) i tako usporavaju proces razlaganja elastina (Gokce i Haznedaroglu, 2008). Ispitivanja određenih flavonoida iz grupe flavona, flavanola, flavonona i izoflavona na proliferaciju ćelija raka crijeva, pokazala su da svi ispitivani flavonoidi ispoljavaju koncentracijski zavisno antiproliferativno dejstvo bez propratnog citostatičkog dejstva (Kuntiz et al., 1999). Utvrđeno je da genistein djeluje kao fitoestrogen i sprečava stvaranje tumora dojke i prostate (Messina, 1991; Steinmetz i Potter, 1991). Za **kvercetin**, ramnetin i izoramnetin pokazano je da mogu redukovati količinu holesterola u serumu jetre (Igarashi i Ohmuma, 1995).

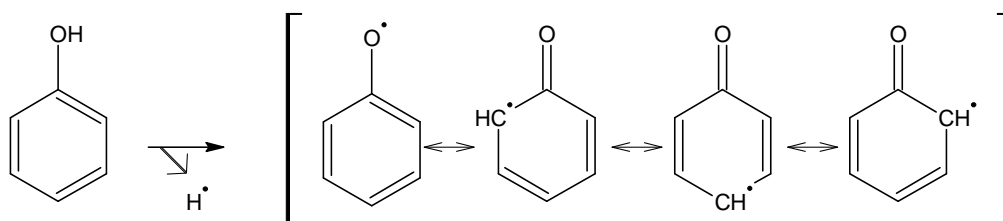
Utvrđena je inhibitorna aktivnost flavonoida na sledeće enzime:

- elastaza,
- hijaluronidaza (kvercetin i naringenin),
- katehol-o-metiltransferaza,
- cAMP fosfodiesteraza,
- aldolaza reduktaza (kvercetin i metoksiflavon),
- protein-kinaza (luteolin),
- 5-lipooksigenaza,
- ciklooksigenaza (Chun-Mao Lin et al., 2002).

Pojedini flavonoidi mogu i aktivirati određene enzime, pa se u literaturi mogu naći podaci da neki proantocijanidini aktiviraju enzim prolin hidrosilazu, što je veoma značajno za sintezu kolagena i održavanje njegove normalne strukture (McDonald et al., 2001).

Za mnoge flavonoide dokazana je visoka antioksidativna aktivnost u različitim *in vitro* sistemima (Ohshima et al., 1998; Jimenez i Garsia-Carmona, 1999; Pekkarinen et al., 1999; Chun-Mao Lin et al., 2002; Mimica-Dukić i Božin, 2008). Poznato je da su najaktivniji biljni antioksidanti fenolna jedinjenja (fenolkarbonske i fenilpropanske

kiseline, fenolni diterpeni, flavonoidi, kumarini i polifenoli), koja pokazuju aktivnost kako u hidrofilnim, tako i u lipofilnim sistemima (Arora et al.,1998). Smatra se da je antioksidantna aktivnost fenola prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi neutrališu slobodne radikale, uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala (slika 3.8.). Povećana stabilnost formiranog fenoksil radikala pripisuje se prvenstveno delokalizaciji elektrona i postojanju više rezonantnih formi. Sa povećanjem stabilnosti nastalog fenoksil radikala povećava se mogućnost nastajanja rekombinantnih reakcija koje dovode do terminacije slobodno-radikalskih procesa (Ohshima et al.,1998).



Slika 3.8. Rezonantna stabilizacija radikala koji nastaje iz fenola

Pored efekta hvatanja radikala, fenoli, a naročito flavonoidi i kumarini, mogu djelovati kao preventivni antioksidanti heliranjem prelaznih metala čime se sprječava formiranje hipervalentnih metalnih formi koje su uključene u procese inicijacije prooksidacije (Arora et al.,1998).

U dosadašnjim istraživanjima se pokazalo da su derivati cimetine kiseline jači oksidanti od derivata benzoeve kiseline, vjerovatno zbog mogućnosti stabilizacije slobodnoradikalskih formi konjugacijom u bočnom lancu. Sa povećanjem broja hidroksilnih grupa povećava se antioksidantna aktivnost flavonoida (Marinova i Yanishlieva, 1992).

3.2.3. Farmakološko djelovanje *Myrtus communis* L.

Mirta se u narodnoj medicini koristi od davnina. Kod antičkih naroda ova lijepa aromatična biljka bila je jako cijenjena i zajedno sa lovorom smatrana je za svetu biljku (Grlić, 1986). Stari Grci jeli su svježe plodove mirte, a kao začin i stomahik upotrebljavali

su ih i u starom Rimu. Mirta ima široku primjenu u medicini, naročito u liječenju respiratornih organa. Istraživanja su pokazala da pomaže u liječenju plućnih i respiratornih infekcija, hroničnog kašlja i tuberkuloze. Poboljšava imunološke funkcije u borbi sa prehladom, gripom i infekcijskim oboljenjima (www.liberherbarum.com). Dokazano je da mirta stabilizuje hormonalne poremećaje tireoidne žlijezde i jajnika, kao i da uspostavlja ravnotežu funkcije hipotireoidne žlijezde. Mirta se često koristi i u terapiji upale mišića, kao i u liječenju hemoroida. U turskoj narodnoj medicini, listovi i plodovi mirte se koriste kao antiseptici, za zarastanje rana i kao veoma efikasno sredstvo u liječenju urogenitalnih bolesti (Baytop, 1999).

Farmakološka aktivnost i ljekovitost mirte usko su povezane sa prisustvom i sastavom etarskih ulja. Utvrđeno je snažno baktericidno i fungicidno djelovanje etarskih ulja mirte. U zvaničnoj medicini se koristi i kao antiseptik, stomahik, adstringens, aromatik (Mišan, 2009). Neka istraživanja su pokazala da etarsko ulje mirte ispoljava i antimalaričnu aktivnost (Milhau et al., 1997.). Mirta se još od davnina koristi u kozmetici, glavni je sastojak preparata za uljepšavanje iz XVI vijeka, znanog kao "andeoska vodica". Od fermentiranih bobica proizvodi se alkoholno piće nazvano »eau d'Agnès«. U nekim dijelovima Italije osušene mirtine bobice upotrebljavaju se kao začin. Danas se koristi za pripremu raznih preparata, jer je pogodna za liječenje masne kože, akni i proširenih pora. Jedan od registrovanih preparata je *Gelomyrtol forte* (n)- koji se upotrebljava za liječenje akutnog i hroničnog bronhitisa, kao i sinuzitisa (Marković, 2005).

Farmakološka aktivnost mirte zasniva se na sinergističkom djelovanju njenih glavnih komponenti, etarskih ulja i fenolnih jedinjenja.

3.3. Slobodni radikali i antioksidanta aktivnost

3.3.1. Slobodni radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali se ubrajaju u najreaktivnije hemijske sisteme. Uzrok njihove neselektivne reaktivnosti leži u njihovom nesparenom elektronu. U jako reaktivne hemijske vrste pored slobodnih radikala ubrajaju se i neradikalni oblici koji su takođe oksidacioni agensi i lako se konvertuju u radikale (tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Najznačajniji slobodnoradikalni i neradikalni sistemi (Halliwell i Whiteman, 2004)

SLOBODNI RADIKALI	NERADIKALSKI OBLICI
Reaktivne kiseonične vrste (ROS)	
superoksid anjon, $O_2^{\bullet-}$ hidroksi radikal, OH^{\bullet} hidroperoksidni radikal, HO_2^{\bullet} peroksi radikal, RO_2^{\bullet} alkoksi radikal, RO^{\bullet} karbonatni radikal, $CO_3^{\bullet-}$ ugljiendioksidni radikal, CO_2^{\bullet}	vodonik peroksid, H_2O_2 hipobromna kiselina, $HOBr$ hipohlorna kiselina, $HOCl$ ozon, O_3 singletni kiseonik, $O_2^1\Delta g$ organski peroksid, $ROOH$ peroksinitrit, $ONOO^-$ peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
Reaktivne hlorne vrste (RCS)	
atomski hlor, Cl^{\bullet}	hipohlorna kiselina, $HOCl$ nitril (nitronijum) hlorid, NO_2Cl hloramini
Reaktivne azotove vrste (RNS)	
azotmonoksidni radikal, NO^{\bullet} azotdioksidni radikal, NO_2^{\bullet}	azotasta kiselina, HNO_2 nitrozo katjon, NO^+ nitroksidni anjon, NO^- dinitrogen tetroksid, N_2O_4 dinitrogen trioksid, N_2O_3 peroksinitrit, $ONOO^-$ peroksinitritna kiselina, $ONOOH$ nitronijum (nitril) katjon, NO_2^+ alkilperoksinitriti, $ROONO$ nitril (nitrinijum) hlorid, NO_2Cl

Iako smatran osnovnim molekulom i simbolom života na planeti, kiseonik je ujedno i najtoksičniji prirodni polutant (Emsley, 2001). Opstanak života na Zemlji nije moguće zamisliti bez kiseonika. Koriste ga svi aerobni organizmi u procesu respiracije za dobijanje energije, pri čemu se on redukuje do vode, a složeni organski molekuli (lipidi, ugljeni hidrati, proteini) podležu oksidativnoj degradaciji.

Od ukupne količine kiseonika u ćeliji, jedan mali deo (2–3%) transformiše se u toksične oblike koji se nazivaju reaktivnim oblicima kiseonika (ROS) (tabela 3.2.).

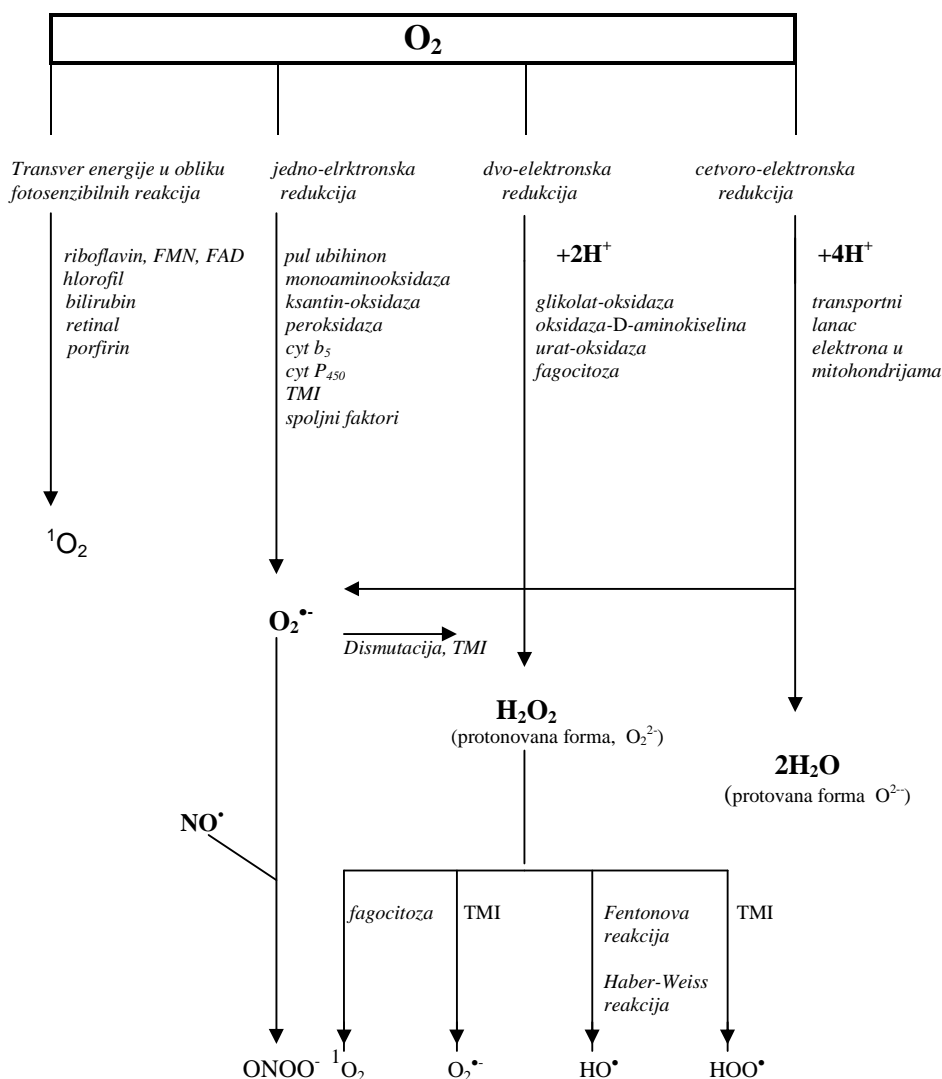
Tabela 3.2. Reaktivne kiseonične vrste značajne za oksidativni stres

Komponenta	Mehanizam nastanka
$O_2^{\bullet -}$ (superoksid anjon radikal)	Jednoelektronska redukcija O_2 (u reakcijama autooksidacije)
HOO^{\bullet} (perhidroksilni radikal)	Protonovana forma $O_2^{\bullet -}$
H_2O_2 (vodoni peroksid)	Dvoelektronska redukcija O_2
OH^{\bullet} (hidroksilni radikal)	Troelektronska redukcija O_2
RO^{\bullet} (alkoksi radikal)	Organski radikal kiseonika
ROO^{\bullet} (peroksi radikal)	Oduzimanje H^+ od organskih hidroperoksida
1O_2 (singletni kiseonik)	Prvo ekscitovano stanje

Kiseonik može biti toksičan i u sledećim oblicima:

- redukovani kiseonični radikali, koji nastaju u ćeliji u toku mnogih metaboličkih procesa,
- aktivirani oblici kiseonika, nastaju u fotohemijским ili termičkim reakcijama, premještanjem jednog nesporenog elektrona iz razvezujuće π orbitale molekula kiseonika i
- molekulski kiseonik (Cadenas i Davies, 2000).

Kiseonik se u prirodi javlja kao biradikal sa dva nesparena elektrona, koji imaju isti spinski kvantni broj i locirani su u suprotno orjentisanim orbitalama. Dovođenjem energije, osnovno stanje molekula kiseonika se može aktivirati pri čemu nastaju dvije reaktivne vrste. Ove dvije reaktivne vrste kiseonika nazivaju se singlet kiseonici (1O_2), u kojima je spinska restrikcija uklonjena te je moć oksidacije značajno povećana. Jedinjenja sposobna da izvrše prenos energije na molekul kiseonika i izazovu njegovu ekscitaciju su riboflavin i njegovi derivati (flavin-mononukleotid i flavin-adenin-dinukleotid), hlorofil, bilirubin, retinal i razni porfirini kao slobodni ili vezani za proteine (Halliwell i Gutteridge, 1986) (slika 3.9.).



Slika 3.19. – Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta. Skraćenice: FMN – flavin-mononukleodit; FAD – flavin-adenin-dinukleotid; cyt – citohrom; TMI – joni prelaznih metala. Za H_2O_2 i $ONOO^{\bullet}$ pokazano je da ćelijska membrana ne predstavlja barijeru za difuziju ovih vrsta unutar ćelije ili među ćelijama (Groves, 1999), te mogu indukovati oksidacioni stres praktično bilo gde u ćeliji.

Kiseonični radikali se u ćeliji obrazuju univalentnom redukcijom kiseonika u različitim kataboličkim i anaboličkim procesima: u respiratornom nizu, prilikom oksidacije ćelijskih biomolekula (tiola, hidrohina, kateholamina, oksihemoglobina), dejstvom enzima (ksantin oksidaze, lipooksigenaze, prostaglandin sintetaze i dr.), dejstvom bivalentnih metalnih jona (Sayre et al., 1999; Cadenas i Davies, 2000).

U reakciji sa biomolekulima (lipidi, proteini, DNA, ugljeni hidrati) oni izazivaju njihova oštećenja i inaktivaciju (Halliwell i Gutteridge, 1989; Žikić et al., 1999). Neke od

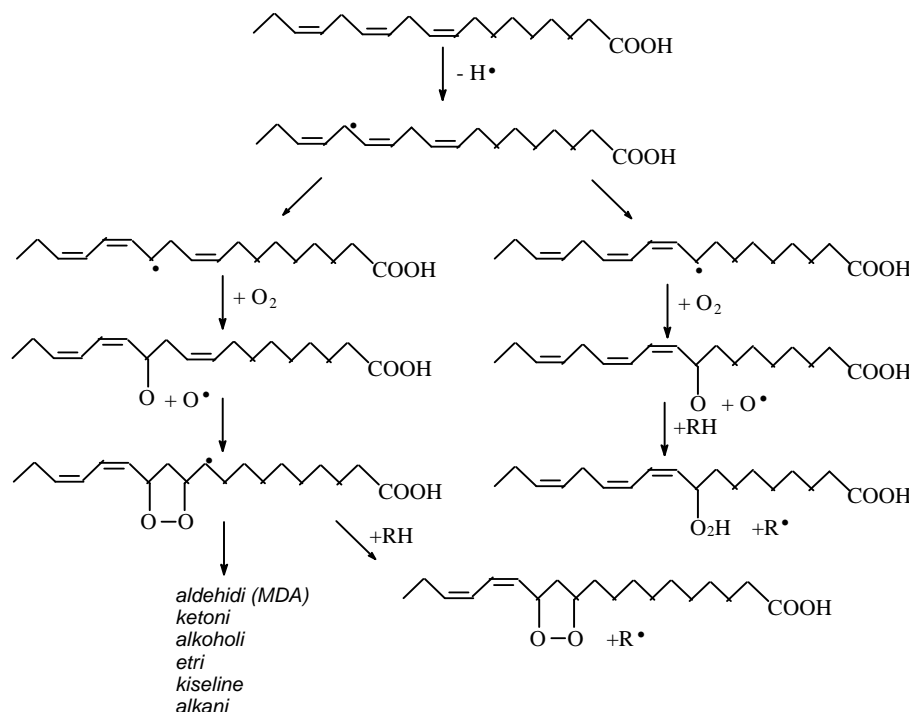
ovih interakcija su vrlo precizno kontrolisani segmenti kaskada prenosa signala ili dio mehanizama imunog sistema, dok druge dovode do patoloških promjena (Groves, 1999). Nezasićene masne kiseline u membranama i tilakoidima hloroplasta lako podliježu procesu peroksidacije koji započinje djelovanjem redukovanih i aktiviranih oblika kiseonika na njihove metilenske grupe (Kaurinović, 2000). ROS (prvenstveno O₂ i superoksid anjon radikal) u normalnim fiziološkim uslovima nisu dovoljno reaktivni da bi spontano stupili u reakciju sa lipidima, pa je za peroksidaciju lipida neophodno prisustvo prooksidanata.

Lipidna peroksidacija može biti inicirana prisustvom slijedećih prooksidativnih vrsta:

- peroksinitrita,
- gvožđe-kiseonik kompleksa (npr. gvožđe-ATP, gvožđe-DNA, hemoglobin, mioglobin, citohrom),
- hidroksi radikala,
- ozona,
- toksičnih vrsta (CCl₄),
- vodonik peroksida (Halliwell et al., 1993; Huie i Neta, 1999).

Peroksidacija lipidnih ćelijskih membrana odvija se mehanizmom lančane slobodno-radikalne reakcije koja uključuje stvaranje novih radikalskih vrsta (lipid-radikali), vezivanje kiseonika, premiještanje dvostrukih veza u nezasićenim kiselinama pri čemu na kraju dolazi do razaranja ćelijskih membrana uz nastajanje velikog broja različitih degradacionih proizvoda (cikličnih i endoperoksida, aldehida i polimerizacionih produkata) (slika 3.10) (Pryor, 1976; Yagi, 1982; Halliwell i Gutteridge, 1999). Ova degenerativna oštećenja uzročnici su velikog broja oboljenja kao što su: dijabetes, kardiovaskularna oboljenja, karcinogeneza, katarakta, neplodnost, neurološka oboljenja, bolesti bubrega, jetre, srca, pluća, upalni procesi, ateroskleroza itd (Martinet et al., 2002, Niwa i Iizawa, 1994; Napoli, 1997; Lewis et al., 1994; Mimica-Dukić i Božin, 2008). Kancerogeneza nastaje kao posledica sukcesivnih promjena molekula DNA izazvanih interakcijom ROS sa purinskim i pirimidinskim bazama (Primiano, 1997). ROS je jedan od glavnih promotora infarkta miokarda, reperfuzionih oštećenja, ateroskleroze i ishemične demencije (Groves, 1999; Brude et al., 1997; Kromhout, 1999).

Najkraće rečeno, oksidativni stres, predstavlja disbalans između oksidanata i antioksidanata. Odnosno, podrazumijeva složene intracelularne i ekstracelularne procese koji dovode do povećanog metaboličkog i hemijskog generisanja (i akumuliranja) reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS- eng. *Reactive Oxygene Species*), što remeti ravnotežu antioksidanti-oksidanti (Shinar et al., 1989). Integritet i funkcionalnost ćelije, kao i organizma u cjelini zavise u svakom trenutku od ravnoteže između produkcije toksičnih radikala i aktivnosti komponenata antioksidativnog sistema zaštite. Ova se ravnoteža može narušiti pušenjem, unošenjem alkohola, dejstvom jonizujućeg i UV-zračenja, hormonima, nedostatkom vitamina, djelovanjem ksenobiotika i dr. Otkriće uloge ROS kod hroničnih degenerativnih bolesti skoro da je podjednako značajno kao i otkriće uloge mikroorganizma kod infektivnih bolesti (Bray, 1999).



Slika 3.10. Mehanizam lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina

3.3.2. Antioksidanti i antioksidantni sistemi

Iako u organizmu postoji neprekidna produkcija slobodnih radikala, do poremećaja homeostaze ne dolazi sve dok postoji ravnoteža između produkcije ROS i mehanizama antioksidantne zaštite koji su prisutni u svim ćelijama i učestvuju u

"hvatanju" i neutralizaciji reaktivnih oblika kiseonika, svodeći oštećenja ćelija i prisutnih biomolekula na minimum (Đorđević et al., 2000).

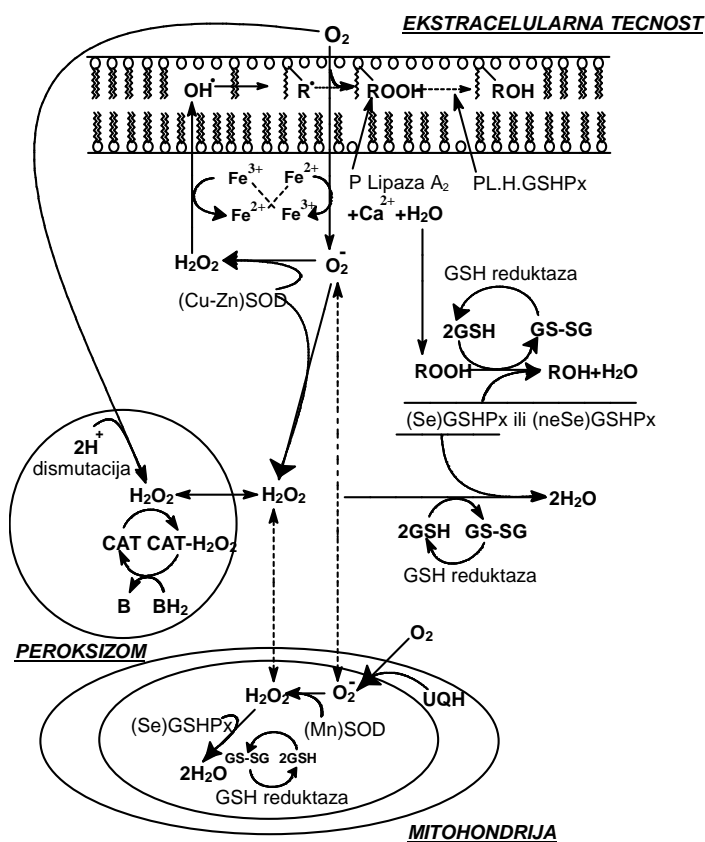
Mehanizmi antioksidantne zaštite aerobnih organizama mogu se razdvojiti u dva nivoa:

➤ **Primarna antioksidantna zaštita**, koja obuhvata:

- enzimske sisteme;
- neenzimske sisteme.

➤ **Sekundarna antioksidantna zaštita**

Primarnu antioksidantnu zaštitu čini nekoliko enzimskih sistema od kojih su najznačajniji: superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSHPx) i katalaza (CAT) (slika 3.11.)



Slika 3.11. Osnovne uloge superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i katalaze. Skraćenice: $(Cu-Zn)SOD$ -bakar-cink superoksid dismutaza; $(Mn)SOD$ -mangan superoksid dismutaza; $(Se)/(neSe)$ -GSHPx-selenijum zavisna/selenijum nezavisna glutation peroksidaza; CAT -katalaza; UQH -ubihinon radikal; $PL.H.GSHPx$ -fosfolipid vodonikperoksid glutation peroksidaza; $GS-SG/GSH$ -redukovani/oksidovani glutation; B i BH_2 -donori vodonika specifični za katalazu (npr. etanol).

Superoksid dismutaza (SOD) katalizuje dismutacije među superoksid anjon radikalima uz produkciju H_2O_2 i kiseonika. Neutralizaciju nastalog H_2O_2 vrše glutathion peroksidaza ili katalaza.

Glutathion peroksidaza (GSHPx) redukuje H_2O_2 i hidroperokside masnih kiselina. Ovaj enzim je prisutan u citosolu gde štiti fosfo- i sfingolipide membrana od oksidativne destrukcije.

Katalaza (CAT), katalizuje razgradnju nastalog H_2O_2 , dok peroksidaza katalizuje oksidaciju različitih supstrata pomoću H_2O .

Pored ovih enzima, postoji i niz drugih sa sličnom funkcijom kao što su selen-nezavisna GSHPx, glutathion reduktaza, redukovani glutathion (GSH) i glukozo-6-fosfat dehidrogenaza.

U sistem primarne antioksidantne zaštite ubrajaju se i proteini transferin i ceruloplazmin koji imaju bitnu ulogu u transportu metalnih jona, zatim albumin, mokraćna kiselina i bilirubin (Primiano et al., 1997). Svi navedeni primarni antioksidanti čine koordiniranu odbranu organizma od reaktivnih radikalskih oblika.

Sistem sekundarne antioksidantne zaštite čine brojna niskomolekularna jedinjenja različitog porijekla i karaktera, kao što su ubihinon, L-askorbinska kiselina, tokoferoli, karotenoidi, fenoli i njihove kiseline, flavonoidi, derivati hidroksicinamata i dr. (Mimica-Dukić, 1997; Arora et al., 1998; Powers i Hamilton, 1999; Draper et al., 2000). Kako je struktura ovih jedinjenja veoma raznovrsna, tako su različiti i mehanizmi kojima ona ostvaruju svoju aktivnost u sistemu antioksidantne zaštite. Najčešće su to hvatači ("skevindžeri") slobodnih radikala, donori protona, inhibitori enzimskih sistema, helatori jona prelaznih metala itd. (Hoult i Paya, 1996; Packer et al., 1999; Lebeau et al., 2000).

U sistem sekundarne antioksidantne zaštite mogu se ubrojiti i enzimi koji aktivno učestvuju u otklanjanju oksidativnih oštećenja nukleinskih kiselina, lipida i proteina, kao što su: endo- i egz nukleaze, DNK polimeraze i ligaze, fosfolipaza A2, GSHPx i fosfolipid-zavisna GSHPx, glikozilaze, kao i brojni proteolitički enzimi. Ovi enzimi "popravljaju" oštećene molekule DNK, uklanjaju oksidovane masne kiseline membranskih lipida i kroz procese resinteze obnavljaju oksidovane aminokiseline i proteine (Božin, 2009).

Brojna *in vitro* ispitivanja različitih frakcija mirte i preparata na njenoj bazi potvrdila su njen izuzetan antioksidantni potencijal. Većina ovih radova ukazuje na to da

je antioksidantni efekat prvenstveno povezan sa prisustvom fenolnih i terpenoidnih jedinjenja (Gardeli et al, 2007; Alamni i Cossu, 2004; Hayder et al, 2004; Soobrattee et al., 2005). Pored navedenih, u literaturi se mogu naći i podaci o antioksidantnom djelovanju pojedinih komponenti izolovanih iz etarskih ulja i ekstrakata mirte kao što su: **1,8- cineol, geraniol, limonen, mircetin-3-O-galaktozid, mircetin-3-O-ramnozid** itd. (Hayder et al, 2004; Yadegarinia et al, 2006.)

3.4. Antibakterijsko djelovanje

3.4.1. Patogeni mikroorganizmi i njima uzrokovane bolesti

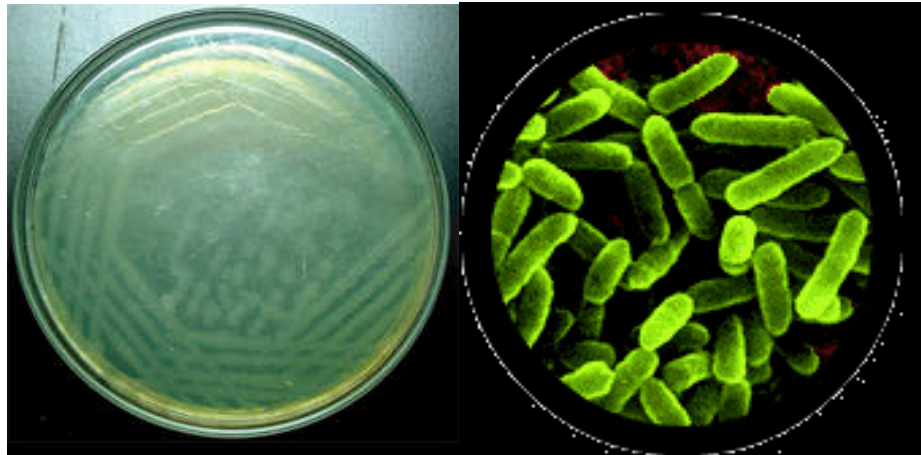
Patogenost se definiše kao potencijalna sposobnost izazivanja bolesti, koju mogu da izazovu različiti agensi: fizičke, hemijske i biološke prirode (bakterije, gljive, virusi, rikecije, praživotinje). Agensi fizičke i hemijske prirode izazivaju nezarazne bolesti, dok biološki izazivaju zarazna oboljenja. Patogenost je genetska i fiziološka osobina izvesnih vrsta mikroorganizama, koji zarazne bolesti mogu da izazovu na različite načine:

- produkcijom toksina koji oštećuju ćelije i tkiva,
- produkcijom supstanci koje ometaju metabolizam ćelija,
- mehaničkim putem,
- razmnožavanjem u samim ćelijama (Marković, 1990).

Medicinski najznačajniji rodovi patogenih mikroorganizma, kao i njima prouzrokovane bolesti su:

Rod *Pseudomonas* koga čine otporni aerobni Gram negativni nefermentativni bacili koji ne pripadaju takozvanim crijevnim bakterijama. Najčešće su prisutni kao slobodni u prirodi, a u oko 10 % ljudi se mogu naći u sastavu fiziološke mikroflore. Za medicinu je najznačajniji *Pseudomonas aeruginosa* uzročnik raznovrsnih infekcija ljudi (slika 3.12.). *Pseudomonas aeruginosa* je raširen u prirodi i zemlji, vodi i biljkama, voću i namirnicama. Potrebe ove bakterije za hranljivim sastojcima su minimalne pa se zato nalazi na mjestima gdje ima manje ostalih mikroorganizama. Uzročnik je oportunističkih infekcija kod imunološki kompromitovanih osoba, kao i infekcija kod opekotina i

intrahospitalnih infekcija. Izaziva destruktivne infekcije oka (keratitis i endoftalmitis). Povremeno se javljaju u bolničkoj sredini kao višestruko rezistentni sojevi uzročnici pneumonija, infekcija rana, alimentarnih toksikoinfekcija i dr. (www.wikipedia.org).



Slika 3.12. *Pseudomonas aeruginosa*

Rod *Klebsiella* čine Gram-negativni diplobacili sa izraženom kapsulom, veoma rašireni u prirodi, i često čine dio normalne mikroflore crijeva. Veoma su značajni kao uzročnici oportunističkih infekcija, pretežno respiratornog trakta. Posjeduju prirodnu ili stečenu rezistenciju na veliki broj antibiotika. U rodu *Klebsiella* nalaze se četiri vrste: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxitoca*, *Klebsiella terrigena* i *Klebsiella planticola*. Za čovjeka su značajne vrste: *Klebsiella pneumoniae* (slika 3.13.) i *Klebsiella oxitoca* (Murray et al, 2005)



Slika 3.13. *Klebsiella pneumoniae*

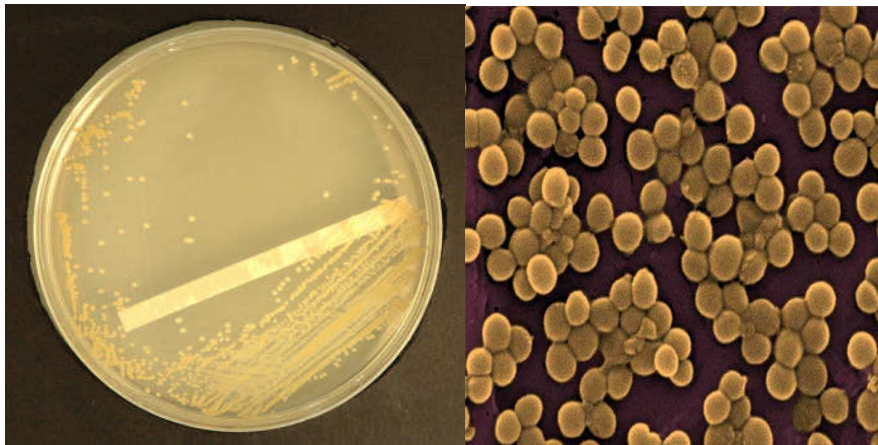
Rod *Bacillus* čine Gram-pozitivni bacili koji u nepovoljnim uslovima stvaraju endospore. Spore su manje od tijela bacila i ne deformišu ga. U ovom rodu se nalazi oko 50 različitih vrsta. Za medicinu imaju značaj *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* je pokretan bacil sa sporom koja je položena centralno i subterminalno (slika 3.14.). Ovaj bacil može izazvati oportunističke infekcije: sepsu kod imunokompromitovanih bolesnika i konjuktivitis kod osoba koje već imaju lezije ili hroničnu upalu sluzokože vežnjače (Euzéby, 2008).



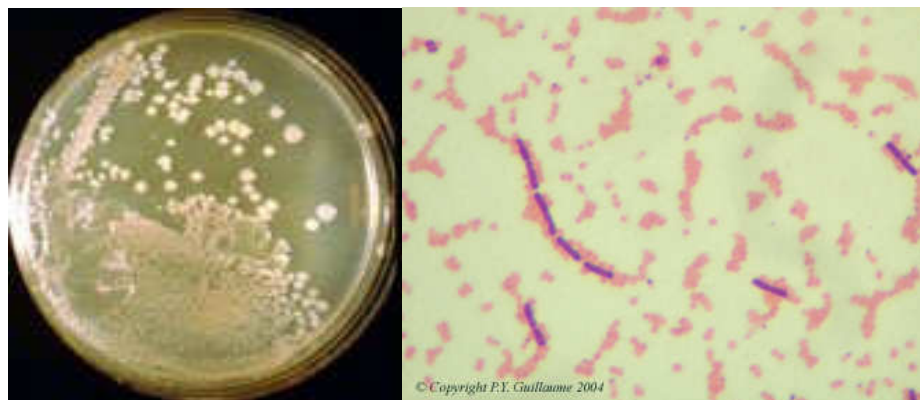
Slika 3.14. *Bacillus subtilis*

Rod *Staphylococcus* čine Gram-pozitivne, fakultativno anaerobne koke. Jedan od najvažnijih predstavnika ovog roda je *Staphylococcus aureus* (slika 3.15). Propisima mnogih zemalja zabranjeno je njegovo prisustvo u vodi za piće, hrani i lijekovima (Ph. Eur. IV, 2002). Isto tako, zaraženim osobama zabranjen je rad u proizvodnji i distribuciji prehrambenih proizvoda. *Staphylococcus aureus* zajedno sa *S. epidermidis* (slika 3.16.) spada u najčešće uzročnike humanih oboljenja. *Staphylococcus aureus* je ubikvitarna bakterija, patogena za ljude i životinje, i veoma se lako prenosi sa jednih na druge. U ljudskoj populaciji javlja se asimptomatski kod svake treće osobe. Ova bakterija u ljudskom organizmu izaziva: infekcije, toksi-infekcije i intoksikacije. Infekcije su obično vezane za gornje respiratorne puteve i mogu biti: lokalne, generalizovane i metastatske. Širenjem kroz meka tkiva, može izazvati celulitis, a limfogeno i hematogeno apcese unutrašnjih organa. Ako se tokom sistemske infekcije razvije sepsa, najčešće posledice su meningitis, septični artritis i osteomijelitis. Patogeni efekti *Staphylococcus aureus* povezani su sa toksinima koje luče. Produkovani endotoksini prouzrokuju brzo trovanje

hranom praćeno dijarejom, grčevima i povraćanjem. Neke intoksikacije su toliko intenzivne, da mogu dovesti do toksićog Ńoka. Pored pomenutog endotoksina, vaŃan nosilac patogenosti je leukocidin, toksin koji razara leukocite kao i α - i β -toksin koji uništavaju membrane eritrocita. Hijaluronidaza, mikroapsula, koagulaza i protein A Ńite bakteriju od fagocitoze (Madigan i Martinko, 2005).

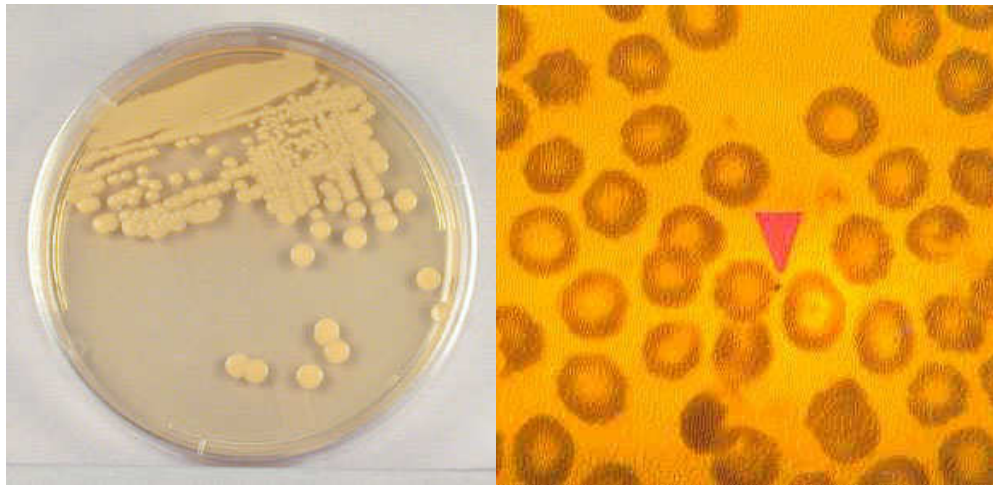


Slika 3.15. *Staphylococcus aureus*



Slika 3.16. *Staphylococcus epidermidis*

Rod *Micrococcus*, ĉine vrste koje su vrlo rasprostranjene u prirodi i vrlo ĉesto prisutne u mlijeku i mlijećnim proizvodima kao i u mesnim preraćevinama (slika 3.17). Ove Gram-pozitivne bakterije su vaŃne u higijeni i tehnologiji proizvodnje prehrambenih proizvoda. Metabolićki proizvodi ovih vrsta i njihova fermentaciona aktivnost daje specifićnu aromu, ukus i boju namirnica (Marković, 1990).



Slika 3.17. *Micrococcus*

Rod *Escherichia* čine Gram-negativni, pokretni, fakultativno anaerobni bacili, koji posjeduju O, H i K antigene. Iako čine najbrojniju vrstu fakultativno aerobne flore digestivnog trakta čovjeka i životinja pojedini sojevi u određenim uslovima uzrokuju različita oboljenja, svrstavaju se u uslovno patogene bakterije ili tzv. oportuniste. U okviru roda *Escherichia* ima nekoliko vrsta, od kojih medicinski značaj ima vrsta *Escherichia coli* (slika 3.18).

Escherichia coli ima više faktora virulencije:

- sposobnost kolonizacije epitelnih ćelija,
- sposobnost da invadiraju ćelije (neki sojevi),
- sposobnost da produkuju enterotoksine (neki sojevi),
- kompletan lipopolisaharidni O-antigen (endotoksin)- svi sojevi,
- produkcija kolicina koji ima antibakterijski efekat na druge bakterije .

Patogenost se ispoljava u sposobnosti ovih bakterija da izazovu dvije grupe oboljenja:

1) *Escherichia coli* uzročnici piogenih infekcija.

Najčešća oboljenja iz ove grupe su cistitis, pijelitis i pijelonefritis, infekcije žučne kese, appendicitis, peritonitis, meningitis i sepsa.

2) *Escherichia coli* uzročnici dijarejnih oboljenja.

Akutna dijarejna oboljenja su problem u svim zemljama svijeta, a naročito u zemljama u razvoju. Po učestalosti, ova oboljenja su na drugom mjestu, odmah iza respiratornih.

Escherichia coli su otporne na niske temperature, dok su na visokim temperaturama umjereno osjetljive. Izražena je pojava rezistencije na brojne antimikrobne lijekove, zbog prenosa R-plazmida konjugacijom. (Rolhion i Darfeuille-Michaud, 2007; Todar, 2007).



Slika 3.18. *Escherichia coli*

3.4.2. Biljni antimikrobni agensi

Biljke se od davnina koriste u prehrambene, začinske i medicinske svrhe. Sve je veće interesovanje za ljekovite biljke koje se od postanka ljudske civilizacije koriste u tradicionalnoj (narodnoj) medicini (Recio i Rios, 1991). Veliko interesovanje naučnika za prirodnim antimikrobnim agensima uzrokovano je brzim porastom rezistencije bakterija na značajan broj hemioterapijskih sredstava. Zbog toga, postoji veliki broj naučnih radova u kojima je utvrđena snažna antimikrobna aktivnost prirodnih fenolnih jedinjenja kao i drugih izolovanih komponenti biljaka. Ispitivanja antimikrobne aktivnosti biljnih flavonoida iz klasa: izoflavanona, izoflavona, dihidroflavonola, halkona, dihidrohalkona i flavana su pokazala značajan antimikrobni potencijal ovih jedinjenja (Bohm, 1998). O jačini antimikrobne aktivnosti biljnih komponenti govori primjer da slobodni izoflavoni djeluju na patogene mikroorganizme čak i pri koncentraciji od 0.005 % (Naim et al., 1974).

Naročito velika pažnja se posvećuje ispitivanju aromatičnih biljaka, jer se zna da mnoga etarska ulja ispoljavaju snažno antimikrobno dejstvo (Yamasaki et al., 1998; Tasouou et al., 1995; Sivropoulou et al., 1995; Marino et al., 2001; Friedman et al., 2002; Soliman i Badeaa, 2002; Yu-Chang Su et al., 2006; Mitić-Ćulafić et al., 2005; Božin et al., 2007; Mimica-Dukić i Božin, 2008). Testiranjem preparata žalfije na patogenoj bakterijskoj vrsti *Staphylococcus aureus*, utvrđeno je da etarsko ulje inhibira inkorporaciju lizina u ćelijski zid bakterije kao i sintezu peptidoglikana, izazivajući na taj način smrt bakterijske ćelije (Đorđević et al., 1998; Runjajić-Antić et al., 1998). Etarska ulja različitih vrsta roda *Mentha*: *Mentha longifolia*, *Mentha pulegium* i *Mentha arvensis*, pokazala su značajnu antimikrobnu aktivnost na širok spektar mikroorganizama, a naročito na *Bacillus subtilis* (Mimica-Dukić i Božin, 2008).

Pojedine supstance izolovane iz etarskih ulja pokazuju veoma visoku antimikrobnu aktivnost. Tako su citral, geraniol, mentol i eugenol ispoljili snažnu *in vitro* aktivnost na veliki broj testiranih bakterija i gljiva (Chamount i Leger, 1992; Pattnak et al., 1997; Stojanović et al., 2000; Friedman et al., 2002). Takođe, karvakrol, timol i pulegon su pokazali snažno antimikrobno dejstvo na širok spektar patogenih mikroorganizama (Simić et al., 2000; Ultee et al., 1998). Karvakrol pokazuje baktericidnu aktivnost na *Bacillus cerus* (Ultee et al., 1998), dok timol djeluje na veliki broj bakterija lokalizovanih u usnoj duplji (Fridman et al., 2002). Pored terpena, mnoge komponente iz klase kumarina (npr. umbeliferon, eskuletin, cikorin) kao i alkaloida, takođe pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost.

Pretpostavlja se da se antimikrobna aktivnost ovih jedinjenja odvija na nekoliko načina:

- na nivou inhibicije sinteze ćelijske membrane,
- narušavanjem strukture različitih enzimskih sistema,
- smanjenjem količine različitih enzimskih sistema (HMG-CoA-reduktaza),
- djelovanjem na genetički materijal mikroorganizaman (De Laurentis et al., 2005).

Međutim, u većini slučajeva, mehanizam djelovanja ispitivanih supstanci na mikroorganizme još uvijek nije poznat.

Brojna *in vitro* ispitivanja etarskih ulja i ekstrakata mirte kao i preparata na njejoj bazi potvrdila su njen izuzetan antimikrobni potencijal. Dokazano je antiviralno djelovanje na sledeće viruse: Epstein-Barr virus, herpes simplex-1, HIV, humani polio virus, stomovezikularni virus i dr. (Ohnishi i Bannai, 1993; Vrijksen et al., 1987; Spedding et al., 1989).

Antibakterijsko dejstvo mirte dokazano je na sledeće bakterijske rodove: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* (Dulger i Gonuz, 2004; Shaheen et al., 2006; DeLaurentis et al., 2005; Yadegarinia et al. 2006; Gündüz et al., 2008; Bonjar, 2004; Mansouri et al, 2001; Dorman i Deans 2000; Ilcin i Digrak, 1998; Sacchetti et al., 2007).

Antifungalno dejstvo dokazano je na sledeće rodove: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Cryptosporidium*, *Curvularia*, *Encephalitozoon*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, *Leishmania*, *Penicillium*, *Plasmodium*, *Pythium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Toxoplasma*, *Trichoderma*, *Trichomonas*, *Trypanosoma* (Rasooli et al., 2002; Dulger i Gonuz, 2004; Yadegarinia et al., 2006; Bharate et al., 2007).

3.5. Mutageneza i antimutagena aktivnost

Istraživanja antimutageneze započela su sredinom XX vijeka u Japanu i antimutagenom se smatra svaki agens koji smanjuje frekvenciju indukovanih spontanih mutacija, bez obzira na mehanizam njegovog djelovanja (Kuroda, 1990). Novija klasifikacija mehanizama inhibicije mutageneze i kancerogeneze predložena od strane De Flora i Ramela (1988), dopunjavana je otkrićima novih načina protektivnog djelovanja (De Flora et al., 2001; De Flora i Ferguson, 2005). Klasifikacija uzima u obzir faze uključene u patogenezu kancera i drugih bolesti sa genetičkom osnovom, analizirajući inhibiciju mutacija i inicijaciju kancera bilo izvan ili unutar ćelije, kao i mehanizme uključene u kasnije faze kancerogeneze (promocija, progresija, invazija i metastaza).

Prema Ferguson et al., 2004, najznačajniji mehanizmi antimutageneze su:

1. ekstracelularni mehanizmi i
2. ćelijski mehanizmi.

Ekstracelularni mehanizmi obuhvataju: inhibiciju usvajanja mutagena, inhibiciju endogenog formiranja mutagena i formiranje kompleksa i/ili deaktivaciju.

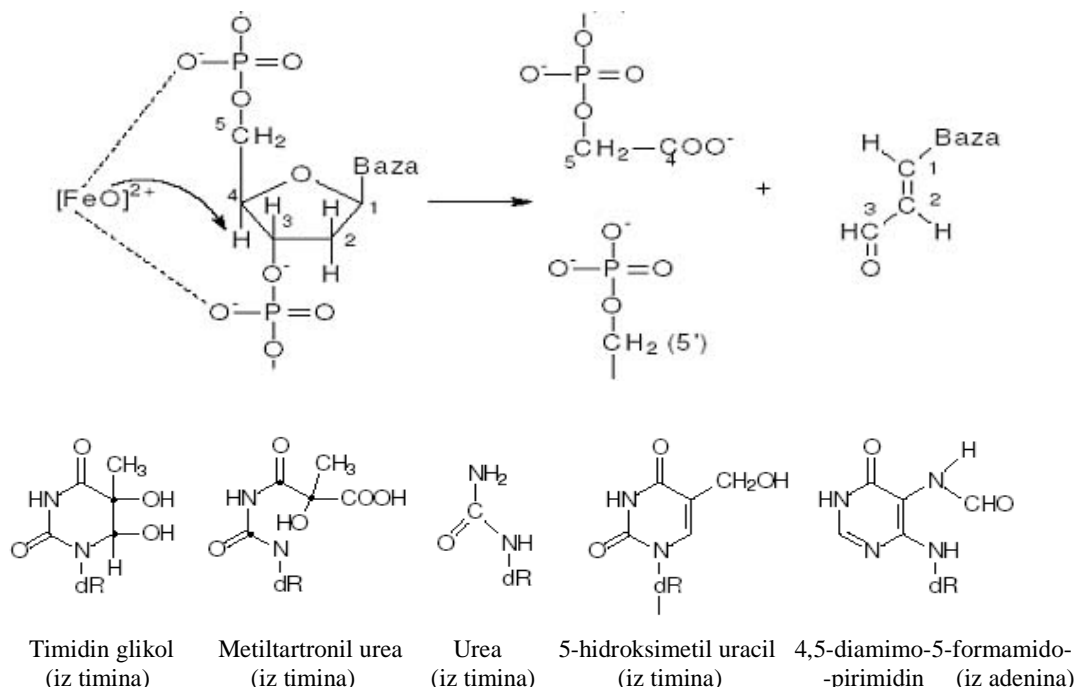
U grupu jedinjenja čiji se mehanizam antimutagenog djelovanja zasniva na formiranju kompleksa i/ili deaktivaciji mutagena spadaju i antioksidanti, koji mogu direktno da vrše sakupljanje ROS, mogu da spriječe lipidnu peroksidaciju reciklirajući druge antioksidante, ili mogu da vezuju jone metala, kao što su gvožđe ili bakar, sprječavajući formiranje slobodnih radikala. Veliki broj različitih eksperimentalnih studija i studija na ljudima je pokazao da režim ishrane bogat antioksidantnim polifenolima štiti od kancerogeneze (Yang et al., 2000).

U ćelijske mehanizme antimutogeneze se mogu ubrojiti: blokiranje ili kompeticija (sakupljanje ROS ili zaštita nukleofilnih mjesta na DNK), stimulacija hvatanja i detoksikacija u ne-ciljnim ćelijama, modifikacija transmembranskog transporta, modulacija enzima koji metabolišu ksenobiotike (inhibicija, aktivacija, indukcija puteva detoksikacije), modulacija metabolizma DNK i reparacionih procesa, stimulacija apoptoze i održavanje stabilnosti genoma (Vuković-Gačić, 2001; Ahmad i Mukhtar, 1999; Berić-Bjedov, 2006).

Veliki broj različitih agenasa može da dovede do oštećenja molekula DNK. Slobodni radikali mijenjaju strukturu genetskog materijala i dovode do mutacija, zbog čega su odgovorni za kancerogenezu, degenerativne procese i apoptozu (Olinski et al., 2002). Brojni primarni etiološki faktori koji dovode do oštećenja DNK molekula su udruženi sa toksičnim efektima slobodnih radikala. Najčešći tipovi oštećenja strukture DNK su:

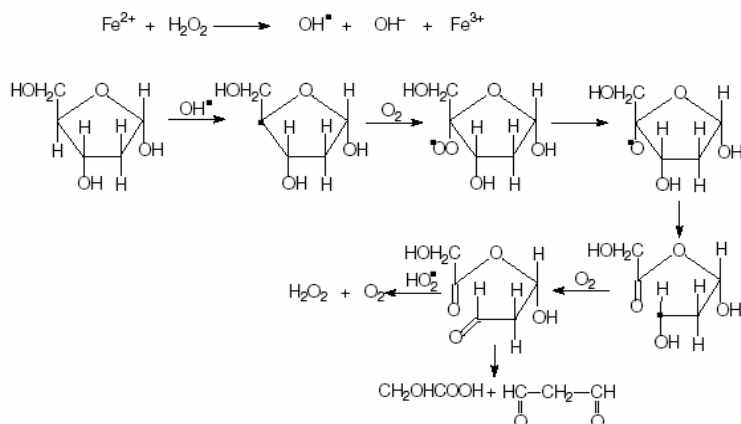
- prekid lanca DNK (jednostrani ili obostrani),
- interakcija baza unutar jedne spirale DNK lanca,
- interakcija baza između dve različite DNK spirale,
- izmjena i gubitak baza,
- modifikacija baza (slika 3.19),
- stvaranje pirimidin dimera i 6-4 fotoprodukata,
- stvaranje masovnih prepreka unutar DNK lanca,
- interakcija sa proteinima,
- interakcija sa lipidnim peroksidima (MDA) i produktima glukooksidacije,
- oksidativna modifikacija dezoksiriboze (Marnett, 2000; Davydov et al., 2003; Slupphaug et al., 2003) (slika 3.20).

Ekspresija opisanih promena može biti akutna ili odložena, jer se nekad može ispoljiti tek nakon više ćelijskih dioba, a često se označava i kao «genomska nestabilnost».



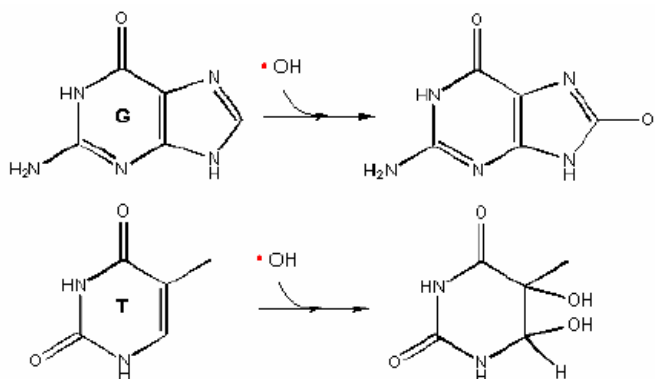
Slika 3.19. Neki od mehanizama oksidativnog oštećenja baza i šećera u DNK.

Oksidativna oštećenja molekula DNK su posledica reakcije ROS sa azotnim bazama ili dezoksiribozom što dovodi do modifikacije baza i prekida u lancu DNK. Takođe i u procesu lipidne peroksidacije nastaju reaktivni intermedijeri koji mogu reagovati sa DNK, kao što je malonil-di-aldehid (MDA) (slika 3.20.)



Slika 3.20. Mehanizmi formiranja MDA iz ugljenikovih atoma C-1, C-2 i C-3 2-dezoksiriboze djelovanjem hidroksilnog radikala.

Najčešći tip oksidativnog oštećenja DNK je oksidacija baze guanina, pri čemu nastaje 8-okso-guanin (8-okso-G), koji ima povećanu tendenciju sparivanja sa adeninom i vodi pojavi GC→TA transverzija (slika 3.21.), kao i timin glikol koji vodi pojavi AT→GC tranzicija (Bjelland i Seeberg, 2003; Slupphaug et al., 2003).



Slika 3.21. Mehanizam nastanka 8-okso-guanina (8-okso-G)

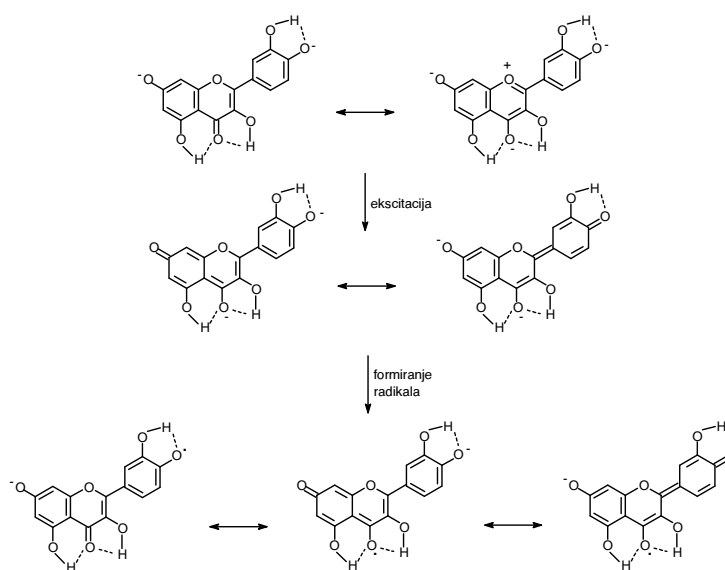
Jednolančani prekidi DNK mogu nastati i kao direktna posledica dejstva slobodnih radikala ili kao intermedijeri reparacionih procesa. Ukoliko se nađu u blizini dva jednolančana prekida u naspramnim lancima, u toku replikacije je moguće njihovo prevođenje u dvolančani prekid (Davydov et al., 2003). Endogeno nastala oksidativna oštećenja DNK molekula mogu povećati frekvencu proklizavanja lanaca tokom replikacije, što vodi pojavi "frameshift" mutacija i time dodatno doprineti nestabilnosti genoma (Loeb et al., 2000). Takođe je nedvosmisleno potvrđeno da mutacije u somatskim ćelijama imaju centralnu ulogu u procesu kancerogeneze. Ključni momenti u inicijaciji kancera su mutaciona aktivacija onkogeni ili inaktivacija tumor supresorskih gena (Kinzler et al., 1996; De Flora, 1998; Jackson et al., 1998; Loeb et al., 2000; De Flora i Ferguson, 2005). Sve je veći broj dokaza da mutacije u somackim ćelijama nisu samo uključene u proces kancerogeneze, već da imaju ulogu u procesu starenja i patogenezi hroničnih degenerativnih oboljenja, kao što su ateroskleroza, srčana oboljenja, glaukom, obstruktivne plućne bolesti (De Flora, 2005).

3.5.1. Antimutageno djelovanje biljnih terpenoidnih i fenolnih jedinjenja

Mnogobrojna ispitivanja su pokazala da veliki broj nutrijenata biljnog porijekla, koji se nalaze kako u voću i povrću, tako i u aromatičnom i ljekovitom bilju, imaju protektivni efekat na zdravlje ljudi, smanjujući rizik od nastajanja malignih oboljenja i drugih bolesti povezanih sa mutacijama (Yu et al., 1995). Otkriće protektivnih faktora dovelo je do razvoja hemoprevencije, pristupa koji podrazumijeva unošenje u organizam agenasa kojim bi se organizam učinio otpornijim na mutagene (kancerogene) i inhibirala pojava ili razvoj bolesti (De Flora et al., 2001). Brojne studije su pokazale da je antioksidantna aktivnost različitih klasa sekundarnih biomolekula usko povezana sa njihovim antimutagenim aktivnostima (Ramos et al., 2003). Dokazano je da su antioksidanti prirodnog porijekla u stanju da smanje oštećenja DNK i proteina indukovanih dimom cigarete i time inhibiraju nastanak raka (Lee et al., 1998). Za terpenoide geraniol, tokotrienol, perililalkohol, β -jonon i limonen utvrđeno je da smanjuju aktivnost enzima HMG-CoA reduktaze (Yu et al., 1995), dok **limonen** i **geraniol** dovode do redukcije tumora (Karlson et al., 1996), a takođe smanjuju i rast transplantiranih tumora (Yu et al., 1995). Hemoprevencija u terapiji raka (strategija kontrole kancera) zasniva se na primjeni hemijskih supstanci koje dovode do blokiranja i usporavanja karcinogenih procesa, kao i do modulacije metaboličke aktivacije hemijskih karcinogena u mutagene intermedijere. Dokazano je da mnoge strukturno različite klase jedinjenja izolovane iz biljaka, uključujući fenolne antioksidante, terpenoide, 1,2-ditiol-3-tione i izotiocijanate blokiraju početne faze karcinogeneze (Yu et al., 1995; Karlson et al., 1996; Primiano et al., 1997).

Uočeno je da je antimutagena aktivnost različitih fenola povezana sa njihovom antioksidantnom aktivnošću (Hayder et al., 2004). Kao snažni antioksidanti, fenolna jedinjenja, različitim mehanizmima neutralizacije slobodnih radikala u ćelijama, mogu da spriječe oksidativna oštećenja DNK i širenje tumora (Ohshima et al., 1998). Fenolna jedinjenja se ubrajaju među najaktivnije antioksidante, a svoju aktivnost ispoljavaju kako u hidrofилnim tako i u lipofилnim sistemima. Njihova visoka antioksidantna aktivnost potvrđena je u različitim *in vitro* sistemima (Morel et al., 1993; Ohshima et al., 1998;

Pekarinen et al., 1999; Mimica-Dukić i Božin, 2008). Antioksidantna aktivnost fenolnih jedinjenja, prvenstveno je rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi uklanjaju slobodne radikale uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala (Arora et al., 1998). Povećana stabilnost formiranog fenoksil radikala pripisuje se delokalizaciji elektrona i postojanju više rezonantnih formi kao što je prikazano na slici 3.22. za **kvercetin** (Bors et al., 1990). Sa povećanjem stabilnosti nastalog fenoksil radikala povećava se mogućnost nastanka rekombinantnih reakcija koje dovode do terminacije slobodnoradikalskih procesa .



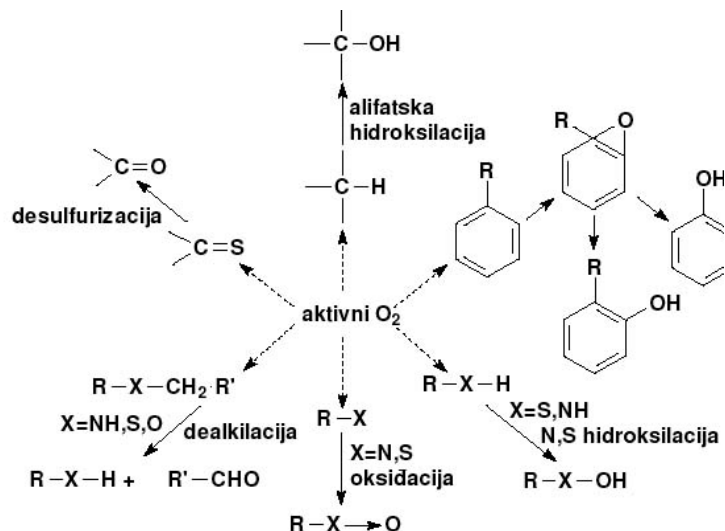
Slika 3.22. Rezonantno stabilizovane radiklske forme kvercetina

Zbog velikog broja potencijalnih reakcionih centara, molekul flavonoida ima mogućnost reagovanja sa više radikala u isto vrejme. Jedan molekul sintetičkog antioksidansa BHT, na primjer, može da reaguje sa dva radikala, dok kod procijanidina taj broj dostiže osam i više.

Drugi mehanizam antimutagenog djelovanja biljnih fenola se zasniva na modifikaciji aktivnosti enzimskih sistema koji su uljučeni u metabolizam ksenobiotika *in vivo*. Transformacija ksenobiotika se odvija u mikrozomima jetre. Ovaj proces se odvija kroz dvije faze u kojima učestvuju različiti enzimski sistemi označeni kao enzimi faze I i enzimi faze II. Faza I uključuje procese kao što su hidroliza, oksidacija, hidroksilacija,

redukcija, dezaminacija itd. (slika 3.23). U ovoj fazi ključnu ulogu imaju enzimi iz grupe oksidaza mješovite funkcije (MFO) od kojih je najznačajniji citohrom P₄₅₀ (CYP₄₅₀).

U drugoj fazi, metaboliti nastali u fazi I, podliježu enzimskim procesima acetilovanja, metilacije ili konjugacije sa glukuronskom kiselinom odnosno sulfatnim anjonom, pri čemu molekuli postaju hidrofilni čime se olakšava njihovo izlučivanje iz organizma putem urina ili žuči.



Slika 3.23. Reakcije koje katalizira citohrom P₄₅₀.

U toku biotransformacije u jetri mnogi ksenobiotici se transformišu u reaktivne oblike (aktiviraju se) koji mogu reagovati sa molekulima DNK i izazvati mutacije (Heo et al., 2001). Poznati primjer aktivacije ksenobiotika je biotransformacija policikličnih aromatičnih ugljovodonika (npr. benzopiren) u visokoreaktivne epoksidge koji veoma lako stupaju u reakcije sa molekulima DNK pri čemu dolazi do narušavanja strukture genetičkog materijala, što često dovodi do neoplastične transformacije ćelija i pojave kancerogeneze. Dokazano je da mnogi sekundarni biljni metaboliti uključujući i neke terpenoide mogu inhibirati enzime faze I (CYP3A4) ili faze II (CYP2A2, 3A1, 2B2 i 2C6) i tako onemogućiti mutageni i kancerogeni uticaj ksenobiotika na organizam (Zhang et al., 1993; Block i Gyllenhaal, 2002). Dokazano je da mnogi sekundarni biljni metaboliti uključujući i mnoge biljne fenole mogu inhibirati enzime MFO sistema i tako onemogućiti aktivaciju, odnosno mutageni i kancerogeni uticaj ksenobiotika na organizam (Zhang et al., 1993., Block i Gyllenhaal, 2002). Tako je dokazano da flavonoidi naringenin i bergamotin izolovani iz grejpfruta inhibiraju CYP3A4, veoma bitan

enzim u metabolizmu ksenobiotika. Pred toga postoje podaci u literaturi o uticaju elagne kiseline na inhibiciju enzima MFO sistema (CYP2A2, 3A1, 2B2, 2C6) *in vitro* (Zhang et al., 1993).

Treći mehanizam antimutagenog djelovanja flavonoida pripisuje se njihovoj sposobnosti da heliraju prelazne metale i tako sprječavaju formiranje hipervalentnih metalnih formi koje su uključene u proces produkcije slobodnih radikala (Arora et al., 1998).

Antimutageni potencijal etarskih ulja i ekstrakata vrste *Myrtus communis* L. nije dovoljno istražen. Prema malobrojnim podacima iz literature možemo zaključiti da ekstrakti ove vrste pokazuju snažnu antimutagenu aktivnost u različitim *in vivo* sistemima (Hayder et al, 2004; Hayder et al, 2008; Chibani et al, 2003).

4. Eksperimentalni dio

4.1. Materijal

4.1.1. Biljni materijal

Za izolovanje etarskih ulja i pripremanje ekstrakata korišćen je osušen list mirte. Biljni materijal sakupljen je na sledećim lokalitetima: Ulcinj, Bar, Budva, Tivat, Kotor i H.Novi u Crnoj Gori. Herbalni uzorci biljaka su deponovani u Herbarijumu Departmana za biologiju, Prirodno matematičkog fakulteta u Novom Sadu i determinisani do nivoa podvrste od strane dr Gorana Anačkova:

Myrtus communis L. 1753 subsp. *tarantina*: No 2-1818, Crna Gora, Ulcinj, 02.01.2007., No 2-1819, Crna Gora, Bar, Stari Grad 02.01.2007., No 2-1820, Crna Gora, Budva, Grbalj 02.01.2007; No 2-1821, Crna Gora, Kotor 02.01.2007., No 2-1822, Crna Gora, Tivat 02.01.2007., No 2-1823, Crna Gora, Herceg Novi 02.01.2007.

4.1.2. Supstance i reagensi

N-(1-naftil)-etilendiamin-dihlorid (NEDA), trihlorsirćetna kiselina (TCA), silika gel "flask" (SDS 9385), silika gel 60 H, TLC ploče 20 * 20 cm sa silika gelom i celulozom na aluminijumu nabavljeni od MARCK KgaA – Darmstad, Nemačka.

DL- α -tokoferol-acetat, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH^{*}), etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina (EDTA), 2-deoksi-D-riboza, 2-tiobarbituratna kiselina (TBA), ksantin i ksantin-oksidaza dobavljeni su od Sigma-Aldrich Chimie GmbH, Njemačka.

Propil-galat (PG), butilovani hidroksi-anisol (BHA) i butilovani hidroksi-toluol (BHT) su nabavljeni od ICN Biochemical-Cleveland, USA.

Anhidrovani natrijum-sulfat, askorbinska kiselina, β -karoten, hidroksilamin-hidrohlorid, natrijum-hidrogenfosfat, natrijum-dihidrogenfosfat, magnezijum-nitrat, kalijum-jodid, sulfatna kiselina i perhlorna kiselina nabavljeni su od REANAL–Budimpešta, Mađarska.

Vodonik-peroksid i gvožđe-(II)-sulfat heptahidrat su dobavljeni od CENTROHEM D.O.O.– Stara Pazova, Republika Srbija.

4.1.3. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi korišćeni za ispitivanje antibakterijske aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata dati su u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Sojevi bakterija korišćeni u ispitivanjima antibakterijske aktivnosti

Bakterijski sojevi	
Izvor	Organizam
ATCC 1228	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 10774	<i>Bacillus subtilis</i>
ATCC 10240	<i>Micrococcus flavus</i>
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NCIB 9111	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
SY 252	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Escherichia coli</i> lpca (IB 112)

Za ispitivanje antimutagenog efekta etarskih ulja i ekstrakata korišćen je bakterijski soj *E. coli* WP2, odnosno njegove linije IC 185 *trpE65* i IC202 *trpE65 oxyR/pKM101* (Blanco et al., 1998).

Svi bakterijski sojevi su porijeklom sa Katedre za mikrobiologiju, Instituta za botaniku Botaničke bašte "Jevremovac", Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Republika Srbija.

Bakterije su čuvane u dubokom LB Agru-u, na + 4 °C i presijavane jednom mjesečno (Booth, 1971).

4.1.4. Hranljive podloge

Tokom ispitivanja antibakterijske i antimutagene aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata korišćene su sledeće hranljive podloge:

- **LA-Luria agar ("Difco"):** NaCl (5 g), bacto tryptone "Difco" (10 g), yeast extract (5 g), 1M NaOH (3ml), agar "Difco" (15 g), destilovana voda (1000 ml);
- **LB-Luria Broth ("Difco") :** NaCl (5 g), bacto tryptone "Difco" (10 g), yeast extract "Difco" (5g), 1M NaOH (3ml), destilovana voda (1000 ml);

- **Müler-Hinton:** Müler-Hinton prah (gotova podloga) (38 g), destilovana voda (1000 ml);
- **Müler-Hinton bujon:** MH bujon prah (22 g), destilovana voda (1000 ml);
- **ET4-minimalni medijum sa triptofanom:** agar "Difco" (15 g), destilovana voda (970 ml), a nakon autoklaviranja dodati: 50 x KS (20 ml), 40% glukoza (10 ml) triptofan (0.5 mg);
- **E4-minimalni medijum:** agar "Difco" (15 g), destilovana voda (970 ml), a nakon autoklaviranja dodati: 50 x KS (20 ml), 40% glukoza (10 ml);
- **50 x KS (50 x koncentrovane soli ili Vogel-Boner E medijum):** K_2HPO_4 (500 g), $MgSO_4 \times 7H_2O$ (10 g), $NaH_2N_4(PO_4 \times 4H_2O)$ (175 g), monohidrat limunske kiseline (10 g), destilovana voda (670 ml);
- **Top agar:** agar "Difco" (6 g), NaCl (5 g), destilovana voda (1000 ml);
- **Triptofan:** triptofan je rastvaran u destilovanoj vodi u koncentraciji 15 mg/ml, pri čemu je finalna koncentracija u podlogama iznosila 0.5 µg/ml.

4.2. Metode

4.2.1. Primijenjene tehnike u fitohemijskim ispitivanjima

4.2.1.1. Izolacija etarskog ulja – metodom hidrodestilacije (HD)

Za izolaciju etarskih ulja primjenjena je metoda hidrodestilacije (HD) po Ph. EUR. IV (2002), uz n-heksan kao zbirni rastvarač.

Postupak: Odmjerenih 100 grama usitnjenog biljnog materijala preliveno je sa 1000 ml destilovane vode u balonu okruglog dna. Vrijeme destilacije iznosilo je 2h i 30 min. Dobijeno etarsko ulje sušeno je prvo pomoću anhidrovanog Na_2SO_4 u toku 24 časa, pa u eksikatoru 1 čas. Nakon toga je n-heksan uparen na rotacionom vakuum-uparivaču. Izolovano ulje je čuvano u eksikatoru do konstantne mase, a nakon toga je mjeren prinos ulja.

Količina etarskog ulja izražena je kao prosječna vrijednost prinosa iz pet mjerenja i izražena u su u g/100 g (%) osušenog biljnog materijala. Ulja su zatvarana u kivete sa teflonskim čepovima i čuvana na +4 °C do momenta analize.

4.2.1.2. Pripremanje ekstrakata metodom maceriranja

Maceriranje biljnog materijala izvršeno je u odnosu 1:6 sa 70% metanolom u vremenu od 48 h.

Postupak: Odmjereno je 100 g usitnjenog biljnog materijala i stavljeno u tamnu bocu, a zatim dodato 60 ml 70% metanola. Ekstrakcija je trajala 48 časova uz povremeno miješanje (mućkanjem). Ovako dobijeni sadržaj procijeđen je kroz lijevak sa vatom u balon od 1l. Sadržaj u balonu uparen je na rotacionom vakuum-uparivaču pri temperaturi od 60 °C, da bi otpario metanol. Vodeni sloj je podvrgnut tečno-tečnoj ekstrakciji u lijevku za odvajanje sa petroletrom radi odmašćivanja i odvajanja lipofilnih supstanci. Nakon odvajanja nepolarnog sloja vodeni ekstrakt uparen je do suva na rotacionom vakuum-uparivaču. Upareni ekstrakti ostavljeni su u eksikatoru radi dodatnog sušenja, do konstantne mase. Količina ekstrakata je određena mjerenjem. Ekstrakti su rastvoreni u 70% etanolu i pripremljeni u koncentraciji od 30%. Ovako pripremljeni ekstrakti čuvani su u bočicama sa teflonskim čepovima na temperaturi od + 4 °C do momenta analize.

4.2.1.3. UV/VIS spektrofotometrija

UV/VIS spektrofotometrija primijenjena je za određivanje UV-detektibilnih (fenolnih) jedinjenja u biljnim ekstraktima. Sva spektrofotometrijska očitavanja urađena su na jednozračnom spektrofotometru CECIL CE 2021. Za mjerenje apsorbance u vidljivom dijelu spektra (350-700 nm) korišćene su plastične pravougaone ćelije (dužina optičkog puta 10 nm).

4.2.1.4. Određivanje ukupnih fenola i flavonoida

a) Određivanje ukupnih fenola (Singleton et al., 1999)

Postupak: 5g ekstrakta rastvori se u 50 ml destilovane vode i filtrira. U 0.5 ml filtrata doda se 2.5 ml 0.2 M Folin-Ciocalteu reagens-a i mućka 5 min. Poslije toga, doda se 2.0 ml pripremljenog rastvora Na₂CO₃ (75 g/dm³). Smješa se inkubira na sobnoj temperaturi 2h, a apsorbancija se očitava na 760 nm. Kao slijepa proba koristi se metanol.

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola konstruisana je standardna kriva hlorigenske kiseline (0-200 mg/dm³). Sadržaj ukupnih fenola izražen je u mg (hlorigenske kiseline)/100 g uzorka.

b) Određivanje ukupnih flavonoida (Dowd-ova metoda) modifikovana po Arvouet-Grand et al., 1994

Postupak: 5 ml metanolnog ekstrakta (0.01 mg/ml) pomiješa se sa 5 ml 2% AlCl₃ u metanolu. Posle 10 min očitava se apsorbancija na 415 nm uz slijepu probu koja sadrži 5 ml rastvora ekstrakta i 5 ml metanola (bez AlCl₃).

Ukupni flavonoidi određuju se na osnovu kalibracione krive dobijene sa rutinom (0-70 mg/dm³) kao standardom. Uzima se srednja vrijednost i izražava kao mg (rutina)/100 g ekstrakta.

4.2.1.5. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS)

Kvalitativna i semikvantitativna analiza sastava etarskih ulja ispitivanih aromatičnih biljaka rađena je na gasnom hromatografu sa masenospektrometrijskim detektorom (GC-MS). Korišćen je Agilent Technologies 6890N-5975C sistem, sa sledećim parametrima:

- gas nosač: He, konstantnog protoka 1,0 ml/min
- injektovana zapremina 0,2 µL uz split 50:1; temperatura inleta 250 °C
- Agilent Technologies HP-5MS 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm kolona, na bazi polidimetilsiloksana sa 5 % fenil-grupa
- temperaturni program: početna temperature 50 °C tokom 1 min, 5 °C/min do 100 °C, zatim 9 °C/min do 200 °C, 200 °C tokom 7,89 min
- temperature transfer-linije 280 °C
- MS sa elektronskom jonizacijom; energija elektrona 70 eV
- temperatura jonskog izvora 230 °C, temperature kvadrupola 150 °C
- akvizicija: Scan mod, u opsegu m/z = 35-400

Podaci su obrađeni u Agilent Technologies MSD ChemStation softveru (revizija D.03.00 SP1), uz povezivanje sa AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and

Identification System, ver. 2.64) i NIST MS Search (ver. 2.0) aplikacijama. AMDIS je korišćen za dekonvoluciju masenih spektara (ekstrakciju čistih spektara iz preklopljenih pikova), dok je NIST MS Search pružio algoritam za pretragu biblioteka komplementaran PBM algoritmu ChemStation-a.

Identifikacija komponenata vršena je poređenjem masenih spektara sa komercijalnim bibliotekama: : Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th Edition (338000 spektara, 289000 jedinjenja), NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 05 (190825 spektara, 163198 jedinjenja), uz dodatnu potvrdu korišćenjem Kovats retencionih indeksa.

Relativni udeo komponenti definisan je kao udeo površine pojedinačnih pikova (određene automatskom integracijom) u ukupnoj površini.

4.2.1.6. Visokoefikasna tečna hromatografska (HPLC-DAD) analiza

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom sa UV detekcijom (High Pressure Liquid Chromatography) i "Diod Array" detektorom (HPLC-DAD) primijenjena je za analizu fenolnih jedinjenja u biljnim ekstraktima. Analize su vršene na aparatu Agilent Technologies Series 1100 (SAD) sa LKB Bromma 2150 HPLC pumpom i LKB Bromma 2140 optičkom jedinicom brze spektralne linije. Hromatografsko razdvajanje izvršeno je na Eclipse XDB-C18 koloni (250 mm x 4,6 mm), uz sistem rastvarača MeOH : 5% HCOOH u odnosima:

1-20 min 30:70

20-30 min 40:60

30-50 min 45:55

50-52 min 60:40

52-60 min 80:20

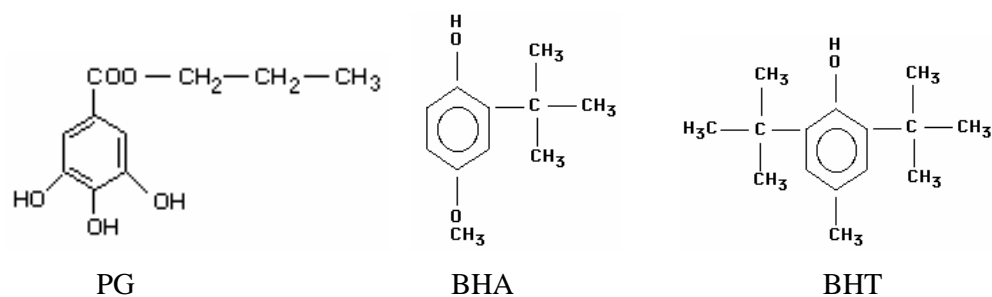
60-65 min 90:10,

pri protoku od 1ml/min. Ispitivani uzorci rastvoreni su u mobilnoj fazi i uvedeni u kolonu preko petlje zapremine 20 µl. Obrada podataka izvršena je pomoću programa LKB Wavescan-EC. Preliminarna identifikacija pojedinih komponenti izvršena je upoređivanjem snimljenih UV spektara sa spektrima standarda i literaturnim podacima (Mabry i sar., 1970; Brewster i Rabinowich, 1990; Miesan i Mohamed, 2001).

4.2.2. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti

Procjena antioksidantne aktivnosti etarskih ulja i metanolnih ekstrakata je izvršena na više *in vitro* modela. Pored ispitivanih uzoraka etarskih ulja i metanolnih ekstrakata, radi komparacije, ispitana je i antioksidantna aktivnost komercijalnih sintetskih antioksidanata:

- 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT),
- propil-galat (PG) i
- (1,1-dimetiletil)-4-metoksifenol (BHA) (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Komercijalni sintetski antioksidanti

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (RSC–Radikal Scavenging Capacity) ispitivanih etarskih ulja i metanolnih ekstrakata mjereno je sposobnošću neutralizacije sledećih radikalskih molekularnih vrsta: OH^\bullet , DPPH^\bullet , NO^\bullet i $\text{O}_2^{\bullet-}$.

4.2.2.1. Određivanje DPPH^\bullet radikala

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala ispitivanih ekstrakata određen je mjerenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH^\bullet radikale (DPPH test) (Mimica-Dukić et al., 2003). Metoda se zasniva na praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog, azot-centriranog DPPH^\bullet radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u redukovano, žuto obojenu formu DPPH-H (Hayder et al, 2004)

Postupak: Pripremljeni su sledeći rastvori:

1. Radna proba, koja sadrži:
 - 1 ml 90 μM rastvora DPPH^\bullet
 - 1 - 60 μl etarskog ulja
 - dopuni se 95%-nim MeOH do 4 ml

2. Kontrola, koja sadrži:

- 1 ml 90 µM rastvora DPPH
- dopuni se 95%-nim MeOH do 4 ml

Apsorbance dobijenih rastvora, kao i kontrole očitavane su spektrofotometrijski na 515 nm nakon 60 min, uz 95% MeOH kao referentni rastvor. Sve probe su rađene u tri ponavljanja.

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (Radical Scavenging Capacity - RSC) računat je na osnovu slijedeće jednačine:

$$\% \text{ RSC} = 100 - \frac{A_{\text{uzorka}} \times 100}{A_{\text{slupe probe}}}$$

Iz vrijednosti dobijenih za RSC određene su IC₅₀ vrijednosti primjenom regresione analize. Sva spektrofotometrijska mjerenja su urađena na jednozračnom UV/VIS spektrofotometru CECIL CE 2021.

4.2.2.2. TLC-DPPH test

Ova metoda služi za identifikaciju onih komponenata biljnog ekstrakta koje su nosioci antiradikalske aktivnosti. Metoda je zasnovana na prskanju razvijenih TLC ploča sa 0.4 mM rastvorom DPPH. Na mjestima na hromatogramu na kojima je došlo do reakcije između aktivne komponente i DPPH radikala javlja se žuto obojenje, dok ostali djelovi hromatograma (na kojima nije došlo do reakcije) ostaju roze boje. Da bi se identifikovale aktivne komponente, ovaj hromatogram se poredi sa uporedo razvijanom TLC pločom koja je poprskana sa vanilin- sumpornim reagensom (Espin i sar., 2000).

Postupak: Po 10 µl ispitivanog ekstrakta nanese se na dve TLC ploče od silika gela (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄; Merck). Silika gel ploče su razvijane u sistemu razvijача (toluen:etil acetat-93:7). Posle razvijanja, ploče su osušene. Jedna ploča je prskana sa vanilin-sumpornim reagensom (5% etanolni rastvor sumporne kiseline i 1% etanolni rastvor vanilina), a druga ploča je prskana sa 0.4 mM rastvorom DPPH. Terpenske komponente su identifikovane na osnovu poređenja boje mrlja i R_f vrednosti sa standardima i literaturnim podacima (Wagner, et al., 1984). Dobijene mrlje su detektovane pri vidljivoj svjetlosti.

4.2.2.3. Određivanje hidroksil radikala (OH[•])

Sposobnost hvatanja OH[•] radikala određena je praćenjem kompeticije između dezoksiriboze i ispitivanih uzoraka za hidroksil radikalima, generisanih Fenton-ovom reakcijom. Nastali degradacioni produkti u procesima oksidacije izazvani prisustvom OH[•] radikala, među kojima je najvažniji malonildialdehid (MDA), su supstance koje reaguju sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA-reaktivne supstance), a koje se mogu detektovati spektrofotometrijski na 532 nm. Svi rastvori i reagensi neophodni za testiranje pripremljeni su neposredno prije ispitivanja.

Postupak: U kiveti je pomiješano 5-100 µl rastvora uzorka sa 0.125 ml H₂O₂ (50 µl 30% H₂O₂ u 100 ml destilovane vode), 0.125 ml FeSO₄ (0.1270 g FeSO₄ * 7H₂O u 50 ml fosfatnog pufera, pH= 7.4) i 0.125 ml 2-deoksiriboze (0.0053 g u 50 ml fosfatnog pufera, pH= 7.4) i dopinjeno fosfatnog pufera, pH= 7.4 do zapremine od 3 ml. Reakciona smješa je inkubirana 60 min. na 37 °C i nakon dodatka 2 ml TBA (3 g TBA, 10.4 ml HClO₄, 120 g TCA u 800 ml destilovane vode) i 0.2 ml EDTA kivete su držane na ključalom vodenom kupatilu 15 min. Nakon hlađenja, spektrofotometrijski je mjerena apsorbanca dobijene smješe. Za svki uzorak urađeno je po četiri ponavljanja.

Inhibicija oksidacije deoksiriboze (%) od strane ispitivanog uzorka izračunata je iz razlike apsorbanca uzorka i slijepe probe u kojoj je uzorak zamijenjen sa fosfatnim puferom. Regresionom analizom određena je 50 % redukcija nivoa hidroksil radikala (IC₅₀).

4.2.2.4. Inhibicija azot (II) oksida (NO[•])

Inhibicija azot-oksid radikala (NO[•]) je određena spektrofotometrijskim mjerenjem produkcije nitritnih jona (Babu et. al., 2001). Azot-oksid produkovan preko nitro-prusida u vodenom rastvoru na fiziološkim pH, reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone koji se mjere pomoću Griess-ove reakcije.

Postupak: U epruveti su pomiješani rastvori uzorka sa 6 ml rastvora natrijum-nitroprusida (0.2967 g natrijum- nitroprusida u 100 ml fosfatnog pufera, pH= 7.4) i inkubirani 150 min. na sobnoj temperaturi, izloženi stalnom izvoru svjetlosti. Nakon inkubacije, 2 ml reakcione smješe se pomiješa sa 2 ml Griess-ovog reagensa (1.0 g sulfanilne kiseline, 2.0 g H₃PO₄ i 0.1 g EDTA u 100 ml destilovane vode). Apsorbanca nastale hromofore mjerena je na 546 nm. Za svaki uzorak urađena su četiri ponavljanja.

Napomena: radi dobijanja što preciznijih rezultata, priprema reagenasa za ovaj test, kao i njihovo sastavljanje u epruvetama, vršeno je u uslovima ograničene svjetlosti.

Na osnovu analiziranih različitih koncentracija istog uzorka određena je koncentracija neophodna za inhibiciju 50% radikala (IC_{50}) regresionom analizom.

4.2.2.5. Određivanje superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$)

Superoksid anjon radikali generisani su u sistemu ksantin/ksantin-oksida, a količina $O_2^{\bullet-}$ određena je nitritnom metodom (Cos et al., 1998) uz modifikacije. Ovaj sistem je korišćen i pri određivanju stepena inhibicije ksantin-oksida.

Postupak: U epruvete se pomiješa 5-100 μ l rastvora uzorka sa 0.8 ml ksantina (0.0019 g ksantina u 100 ml fosfatnog pufera, pH= 7.5), 0.8 ml hidroksilamina (0.0035 g hidroksilamina u 100 ml fosfatnog pufera, pH= 7.5), 0.8 ml EDTA (0.0073 g EDTA u 100 ml fosfatnog pufera, pH= 7.5) i dopuni sa fosfatnim puferom do konačne zapremine od 3.2 ml. Reakcija počinje dodatkom 0.8 ml ksantin-oksida (3.12 mU/ml u fosfatnog pufera, pH= 7.5). Reakciona smješa (ukupne zapremine od 8 ml) inkubira se na 37 °C u vremenu od 30 min. Nakon inkubacije, u cilju detekcije superoksida, doda se 0.4 ml bojenog reagensa (0.3300 g sulfanilne kiseline, 0.0055 g N-(1-naftil)-etilendiamin-dihlorid (NEDA) i 16.7 ml AcOH rastvoreno u 100 ml fosfatnog pufera, pH= 7.5). Reakciona smješa se inkubira 30 min. na sobnoj temperaturi i nakon toga se mjeri apsorbanca na 550 nm.

Kapacitet redukcije superoksid radikala izračunat je iz razlike apsorbanca uzorka i slijepe probe u kojoj je rastvor ksantin-oksida zamijenjen sa puferom. Za svaku pojedinačnu koncentraciju rađena su četiri ponavljanja. Regresionom analizom određena je 50 % redukcija nivoa superoksida (IC_{50}).

4.2.2.6. Inhibicija enzima ksantin-oksida (XOD)

Inhibicija enzima ksantin-oksida (XOD) određena je praćenjem smanjenja produkcije mokraćne kiseline pomoću istog testa koji je korišćen za određivanje redukcije superoksid anjon radikala (Cos et al., 1998), ali bez dodatka bojenog reagensa.

Postupak: U epruvete se pomiješa 5-100 μ l rastvora uzorka sa 0.8 ml ksantina (0.0019 g ksantina u 100 ml fosfatnog pufera, pH= 7.5), 0.8 ml hidroksilamina (0.0035 g

hidroksilamina u 100 ml fosfatnog pufera, pH= 7.5), 0.8 ml EDTA (0.0073 g EDTA u 100 ml fosfatnog pufera, pH= 7.5) i dopuni sa fosfatnim puferom do konačne zapremine od 3.2 ml. Reakcija počinje dodatkom 0.8 ml ksantin-oksidge (3.12 mU/ml u fosfatnog pufera, pH= 7.5). Reakciona smješa (ukupne zapremine od 8 ml) inkubirana je na 37 °C u vremenu od 30 min. Nakon inkubacije reakcione smješe, reakcija se zaustavlja dodatkom 0.4 ml HCl (8.97 ml HCl u 100 ml destilovane vode) i mjeri se apsorbancija dobijenog rastvora na 290 nm.

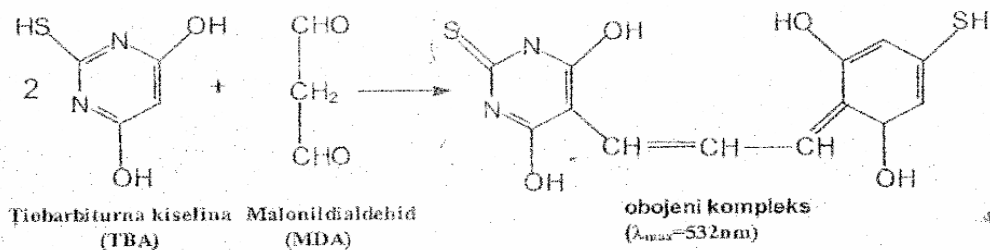
Produkcija mokraćne kiseline određena je iz razlika apsorbancija uzorka i slijepe probe koja je umjesto ksantin-oksidge sadržavala fosfatni pufer, pH= 7.4. Za svaku pojedinačnu koncentraciju rađena su četiri ponavljanja. Linearnom regresionom analizom određeno je 50 % redukcije nivoa superoksida (IC_{50}).

4.2.2.7. Određivanje lipidne peroksidacije (LP)

Određivanje lipidne peroksidacije vršeno je primjenom TBA-testa (Moore et al., 1998). Kao model-sistem bioloških membrana korišćen je komercijalni preparat lipozoma "PRO-LIPOZOMA S" sa 30 % fosfatidilholina soje, pH= 5-7. Za istraživanja su korišćeni mali unilamelarni lipozomi prečnika 225-250 nm sa udjelom fosfolipida od 3%, dobijeni rastvaranjem komercijalnog preparata u destilovanoj vodi (1:10), na ultrazvučnom kupatilu, 30 min na sobnoj temperaturi.

Intenzitet LP izražen preko procenta inhibicije malonildialdehida (MDA) nastalog kao krajnji proizvod peroksidacije nezasićenih masnih kiselina indukovane sa Fe^{2+} /askorbatom, u preparatu lipozoma (Slika 4.2.).

Postupak: U kivetu se pomiješa 60 μ l rastvora lipozoma, 20 μ l $FeSO_4$ (2.78 g $FeSO_4$ u 100 ml destilovane vode), 20 μ l askorbinske kiseline (0.0615 g askorbinske kiseline u 100 ml destilovane vode) i 1-100 μ l rastvora uzorka i 2.9 ml fosfatnog pufera (pH= 7.4). Smješa se inkubira 60 min na 37 °C. Nakon inkubacije doda se 2 ml TBA (3 g TBA, 10.4 ml $HClO_4$, 120 g TCA u 800 ml destilovane vode) i rastvor zagreva do ključanja u toku 15 min. Smješa se centrifugira 10 min na 4000 o/min i nakon toga se određuje apsorbancija supstituenta.



Slika 4.2. TBA-test; Reakcija formiranja obojenog kompleksa TBA sa MDA

Inhibicija LP određena je iz razlike apsorbanci uzoraka i slepe probe u kojoj je uzorak zamijenjen puferom. Za svaku pojedinačnu koncentraciju rađena su četiri ponavljanja. Koncentracija na kojoj je postignuto 50% inhibicija (IC_{50}) određena je linearnom regresijom.

4.2.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

4.2.3.1. Oživljavanje liofiliziranih sojeva

Postupak: U epruvete se razlije po 2 ml LB. Špatulom iz liofiliziranih slojeva zahvati se kultura i uroni u LB. Zasiјane kulture zajedno sa kontrolnim LB-om, su inkubirane u termostatu na 37 °C preko noći.

4.2.3.2. Pripremanje prekonoćne kulture

Postupak: Sa odgovarajućih išaranih ploča ezom se uzme jedna kolonija i prenese u 2 ml LB hranljive podloge. Zasiјane kulture zajedno sa kontrolnim LB su inkubirane 24 h na 37 °C u termostatu.

4.2.3.3. "Disk diffusion" test

Disk-difuziona metoda zajedno sa dilucionom metodom predstavlja dva osnovna načina testiranja biljnih ekstrakata koji se ne mogu sterilisati filtracijom. Prednost korišćene metode ogleda se u maloj količini uzorka koja je potrebna za ispitivanje, kao i mogućnost testiranja većeg broja (3-6) uzoraka po Petri kutiji (Van den Berghe, 1991). Osnovni nedostatak ove metode je da zavisi od sposobnosti difuzije ispitivane supstance u

hranljivu podlogu, pa samim tim koncentracije supstance nisu dovoljno homogene u poređenju sa dilucionom metodom. Takođe, prilikom aplikacije supstance na disk gotovo je nemoguće odrediti količinu supstance koja je difundovala u podlogu. Zbog toga su klasične disk-difuzione metode manje pogodne za određivanje vrijednosti antimikrobnog djelovanja (prvenstveno MIC), koje bi se kasnije mogle koristiti za poređenje aktivnosti (Hadacek i Greger, 2000).

Postupak: na adekvatno obilježene Petri kutije sa Müeler-Hinton hranljivom podlogom se razlije 3ml rastopljenog TA₇ agra sa 0,1 ml prekonocne kulture odgovarajućeg bakterijskog soja. Na filter papire se nanose odgovarajuće koncentracije etarskog ulja i ekstrakata. Primijenjene koncentracije po disk papiru iznosile su 10 i 20 µl. Nakon upijanja, Petri kutije se inkubiraju na 37 °C 24 h u termostatu. Nakon isteka 24 časa lenjirom ili milimetarskim papirom se mjeri prečnik zona inhibicija rasta.

4.2.3.4. Mc Farland standardi

Najčešće korišćen metod za standardizaciju inokuluma su Mc Farland standardi. Ovi standardi se pripremaju od 1% sumporne kiseline i 1,175% barijum-hlorida pri čemu se dobija barijum-sulfat sa odgovarajućom optičkom gustinom. Najčešće se koristi 0,5 Mc Farland (199,5 ml 1% sumporne kiseline i 0,5 ml barijum-hlorida). Ovaj rastvor se razlije u test epruvete i zatvori. Ove epruvete se čuvaju u mraku na sobnoj temperaturi. 0,5 Mc Farland standard odgovara turbiditetu bakterijske suspenzije 1.5×10^8 CFU/ml (Hindler, 1995).

4.2.3.5. Standardizacija inokuluma

Pripremljeni inokulumi (5 ml 1M magnezijum sulfata i 0,1 ml bakterijske suspenzije) i Mc Farland standard se dobro homogenizuju vorteksovanjem. Pod osvjetljenjem se posmatraju obje epruvete postavljene jedna do druge nasuprot bijelom papiru na kom su izvučene horizontalne crne linije različitih debljina. Poređenje se vrši posmatranjem crnih linija kroz rastvore. Ako je suspenzija suviše gusta teže se vide linije kroz rastvor suspenzije nego kroz Mc Farland standard i potrebno je razrijediti suspenziju dodavanjem sterilne podloge. Ako se linije lakše uočavaju kroz suspenziju nego kroz Mc Farland standard potrebno je zgusnuti suspenziju dodavanjem test organizma (Hindler, 1995).

Jedan od alternativnih puteva za određivanje gustine test suspenzije je spektrofotometrija (Simić, 1989). Zbog veće preciznosti u ispitivanju korišćena je ova metoda.

4.2.3.6. Diluciona metoda

Postupak: Pripremi se serija dvostrukih razblaženja određene koncentracije antibiotika. Kao medijum se obično koristi Müller–Hinton bujon. Na početku ovog testa treba odrediti optičku gustinu na kojoj se zna da u bakterijskoj suspenziji ima oko $4\text{-}5 \times 10^6$ CFU/ml. U svaku epruvetu se stavi 2 ml MH bujona; 0,1 ml standardizovane bakterijske suspenzije i određena koncentracija rastvora etarskog ulja, odnosno, ekstrakta mirte. Kao kontrole se koriste sledeće:

- 1) K1: samo MH bujon – 2 ml;
- 2) K2: 2 ml MH bujona + 0,1 ml standardizovane bakterijske suspenzije (kontrola rasta);
- 3) K3: 2 ml MH bujona + 0.1 ml standardizovane bakterijske suspenzije + etanol odnosno n-heksan (zavisno dali radimo etarsko ulje ili ekstrakt) Ovom kontrolom ispitujemo i kako rastvarač djeluje na bakterijskii soj.

U MIC testu se koriste kulture koje su u stacionarnoj fazi rasta. Važno je napomenuti da se mora voditi računa da pri izvođenju MIC testa sve bakterije moraju doći u antibakterijski rastvor, tj. da ne ostanu neke bakterije na zidu epruvete ili iznad meniskusa antibakterijskog rastvora, jer mogu zadržati vijabilnost tokom inkubacije MIC rastvora sa test organizmima (Mahon i Munuselis, 1995). Epruvete se zatim inkubiraju preko noći na 35 °C. Nakon inkubacije MIC se određuje vizuelno na najnižoj koncentraciji koja inhibira rast što se konstatuje po odsustvu замуćenosti jer je MIC najniža koncentracija na kojoj nema rasta. Rast se konstatuje kao замуćenje. Za provjeru tačnosti utvrđenog MIC-a vrši se zasijavanje sterilnom ezom kulture iz prve epruvete u kojoj nema замуćenosti na Petri kutiji. Ukoliko se nakon inkubacije ne pojavi rast na Petri kutiji potvrđujemo pretpostavljeni MIC (Mahon i Munuselis, 1995).

4.2.4. Metode primjenjene u ispitivanju antimutagene aktivnosti

4.2.4.1. Određivanje toksičnog efekta ispitivanih supstanci

Ovaj test je korišćen za utvrđivanje minimalne koncentracije ispitivanih uzoraka, koja ne djeluje toksično na ispitivani test organizam (*E. coli* IC185 i IC202).

Postupak: u 3 ml otopljenog top agra, razlivenog u test- epruvete i ostavljenog u hiting-bloku na 45°C, dodavano je 0,1 ml razblaženja 10^{-5} prekonocne kulture bakterijskih sojeva *E. coli* IC185 i IC202 i određena količina ispitivane supstance, nakon čega je smješa razlivena na LA podlogu. Inkubacija bakterija je vršena 24 h na 37 °C, nakon čega je određivan ukupan broj ćelija. Procenat preživelih ćelija računat je u odnosu na kontrolu (podloga bez ispitivane supstance). Isti broj izraslih kolonija ukazivao je na nepostojanje toksičnog efekta. Svi eksperimenti rađeni su u okviru netoksičnih koncentracija.

4.2.4.2. "Spot" test

Spot test ili test inhibicije rasta je brza i relativno gruba metoda za određivanje citotoksičnog efekta ispitivane supstance, koja nastaje kao posledica oksidativnog oštećenja.

Postupak: U 3 ml top agra, razlivenog u epruvete i ostavljenog u hiting-bloku na 45 °C dodavano je 0,1 ml prekonocne kulture bakterijskih sojeva *E. coli* IC185 i IC202, nakon čega je smješa razlivena na LA podlogu. Na očvršli top agar postavljeni su filter papiri dijametra 10 mm, na koje su nanošena različita razblaženja ispitivane supstance. Nakon prekonocne inkubacije, u slučaju toksičnog efekta oko diska se mogla uočiti zona inhibicije rasta.

4.2.4.3. Određivanje antimutagenog efekta na spontanu i t-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202

Test je primijenjen za određivanje spontane i t-BOOH (terc-butilhidroperoksid) indukovane mutageneze u *E. coli* IC202.

Postupak: U 3 ml otopljenog top agra, razlivenog u test epruvete i ostavljenog u hiting-bloku na 45 °C, dodavano je po 0,1 ml sveže prekonocne kulture bakterijskog soja *E. coli* IC202. Zatim su u test-epruvete aplikovane različite količine etarskog ulja: 5 µl;

7,5 µl; 10 µl i 15 µl, (što odgovara finalnoj koncentraciji od: 0,05; 0,075; 0,1 i 0,15 µl/Petri-kutiji), odnosno ekstrakata u koncentracijama 0,05; 0,1; 0,25 i 0,5 µl/Petri-kutiji. Ovako pripremljena smješa razlivana je na minimalnu ET4 podlogu (minimalni medijum suplementiran sa 0,5 µg/ml triptofana). Za određivanje indukovane mutageneze, pored prekonocne kulture i testirane supstance, dodavan je vodeni rastvor mutagena t-BOOH (100 mM) u finalnoj koncentraciji od 25 µg/ petri-kutiji. Nakon hlađenja petri-kutije su inkubirane 48 h na 37 °C, nakon čega je određivan broj Trp⁺ revertanata.

Paralelno je praćena i kontrola rasta ispitivanog bakterijskog soja (bez testirane supstance), kao i kontrola primijenjenih rastvarača (n-heksan i etanol) koji su aplikovani u količini od 15 µl/ petri kutiji.

4.2.4.3. Provjera broja pre-egzistirajućih mutanata

Za evaluaciju broja spontanih mutanata koji su nastali u toku prekonocne inkubacije, vršeno je zasijavanje na E4 minimalni medijum bez dodatka triptofana.

Postupak: U 3 ml otopljenog top agra, razlivenog u epruvete i ostavljenog u hiting-bloku na 45°C dodavano je 0,1 ml svježe prekonocne kulture bakterijskog soja *E. coli* IC202. Smješa je razlivana na minimalnu E4 podlogu i petri šolje su inkubirane u termostatu na 37 °C u toku 48 h, nakon čega je određivan broj Trp⁺ pre-egzistirajućih revertanata. Samo prekonocne kulture sa malim brojem pre-egzistirajućih mutanata (< 15 revertanata / petri-kutiji) korišćene su za pravljenje trajnih zamrznutih kultura za naredne eksperimente.

4.2.4.4. Izračunavanje procenta antimutageneze

Antimutageneza je kvantifikovana izračunavanjem inhibicije mutageneze. Procenat inhibicije mutageneze (I) se izračunava po formuli koju su dali Ong et al., (1985) :

$I = (1 - N_t / N_c) * 100$ (izražen u procentima), gde je :

N_t- broj indukovanih revertanata / petri kutiji sa ispitivanom supstancom

N_c- broj indukovanih revertanata / petri kutiji bez ispitivane supstance.

4.2.4.5. Procjena antimutagenog efekta

Za procjenu antimutagenog potencijala korišćena je kategorizacija predložena od strane Wall i sar. (1988). Procenat inhibicije mutageneze se kreće u intervalu:

0-20% - supstanca bez antimutagenog efekta;

20-40% - slab antimutageni potencijal;

40-60% - antimutageni potencijal;

60-80% - jak antimutageni potencijal;

> 80% - sumnja u toksični efekat.

4.3. Statistička obrada podataka

Svi podaci dobijeni u ispitivanjima, kao i rezultati određivanja obrađeni su pomoću softverskog paketa Microsoft Excel for Windows ver. 2000, a svi rezultati o hemijskom sastavu (sem rezultata HPLC ispitivanja) pomoću programa STATISTICA for Windows ver. 2008.

5. Rezultati i diskusija

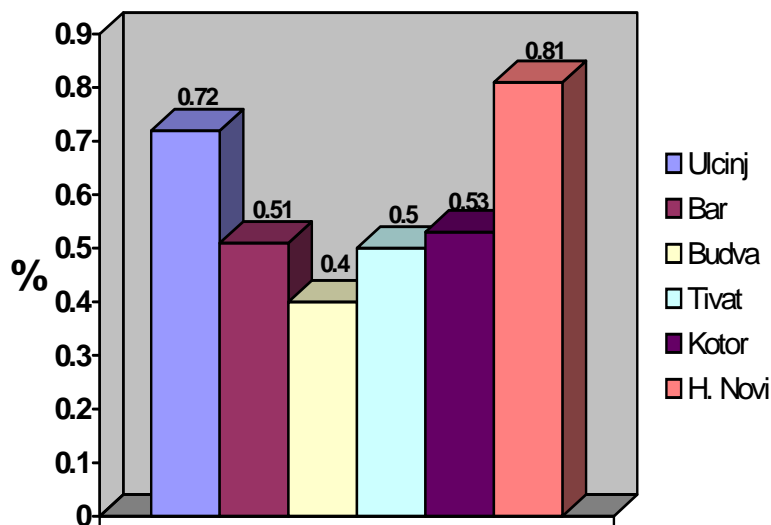
5.1. Hemijski sastav etarskih ulja *Myrtus communis* L.

Analize etarskog ulja u ispitivanim uzorcima mirte obuhvatale su:

- Određivanje količine ukupnog etarskog ulja;
- Hemijski skrining etarskog ulja primjenom TLC (Thin Layer Chromatography) tehnike;
- Kvalitativna i kvantitativna analiza etarskih ulja primjenom GC-MS tehnike.

5.1.1. Određivanje količine ukupnog etarskog ulja

Rezultati količine ukupnih etarskih ulja u osušenim listovima mirte, dobijenih metodom hidrodestilacije po Ph. Eur. IV (2002), prikazani su na slici 5.1. Prikazane vrijednosti izražene su u g/100 g (%) osušenog biljnog materijala. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost iz pet ponavljanja.



Slika 5.1. Količina etarskih ulja (%) mirte u uzorcima sa različitih lokaliteta.

Vrijednosti količine etarskih ulja mirte u ispitivanim uzorcima odgovaraju podacima iz literature (Boelens i Jimenez, 1992; Bradesi et al., 1997.), za uzorke sa lokaliteta Ucinj i H. Novi (0.8%), dok se količine ulja za ostale lokalitete nalaze ispod ove vrijednosti (0.40-0.53%). Interesantno je pomenuti da najsjeverniji (H. Novi) i najjužniji lokalitet (Ucinj) imaju približno iste vrijednosti količine etarskih ulja. Takođe, se može primijetiti da količina etarskih ulja postepeno opada idući od juga i sjevera

Na hromatogramu (slika 5.2) se mogu vidjeti sledeći uzorci (gledano s lijeva na desno): standard linalol i etarsko ulje mirte sa lokaliteta – Ulcinj, Bar, Budva, Kotor, Tivat i Herceg Novi. Kao što se može vidjeti sa hromatograma etarska ulja mirte su veoma bogata terpenskim jedinjenjima. Ne primjećuje se razlika u kvalitativnom sastavu etarskih ulja sa različitih lokaliteta.

Na hromatogramu se zapaža nekoliko karakterističnih mrlja. Poređenjem boje mrlja i Rf vrijednosti (tabela 5.1.) sa standardima i literaturnim podacima (Wagner, et al., 1984), detektovane su sledeće dominantne terenske komponente u etarskim uljima mirte sa Crnogorskog primorja: α -terpineol (mrlja 1), linalol (mrlja 2), 1,8-cineol (mrlja 3), metil eugenol (mrlja 4), grupa acetilovanih monotrpenskih alkohola (mirtenil acetat, linalil acetat, geranil acetat, α -terpinil acetat, neril acetat) (mrlja 5) i α -pinen (mrlja 6).

Tabela 5.1. Komponente etarskog ulja mirte identifikovane na TLC hromatogramu

Broj	Komponenta	Rf-vrijednost	Boja
1.	α -terpineol	0.26	plava
2.	linalol	0.42	tamno plava
3.	1,8-cineol	0.55	svijetlo plava
4.	metil eugenol	0.64	ljubičasta
5.	monotrpenski alkoholi	0.76	zelena
6.	α -pinen	0.95	ljubičasta

5.1.3. Kvalitativni i kvantitativni sastav etarskog ulja mirte

Analiza sastava etarskih ulja mirte izvršena je primjenom GC-MS metode. Rezultati su izrženi kao relativni udio (%) komponenata u etarskom ulju i prikazani u tabelama (5.2-5.7) i na slikama (5.3-5.9).

a) Hemijski sastav etarskog ulja mirte sa lokaliteta Ulcinj

U etarskom ulju mirte sa lokaliteta Ulcinj identifikovano je 29 komponenti. Sve identifikovane komponente prikazane su u tabeli 5.2.

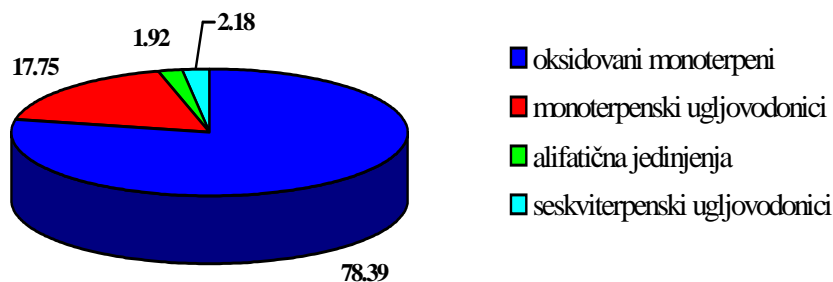
Tabela 5.2. Hemijski sastav etarskog ulja mirte sa lokaliteta Ulcinj

Redni broj	Komponenta	KI ^a	% ^b
1	izobutil izobutirat	914	1.89
2	α -tujen	927	0.37
3	α -pinen	934	14.67
4	2- β -pinen	978	0.16
5	β -mircen	992	0.31
6	α -felandren	1006	0.40
7	δ -3-karen	1012	0.48
8	α -terpinen	1018	0.25
9	p-cimen	1026	0.86
10	limonen	1030	4.10
11	1.8-cineol	1032	25.68
12	(E)- β -ocimen	1049	0.35
13	γ -terpinen	1060	0.92
14	α -terpinolen	1090	1.05
15	linalol	1101	10.05
16	4-terpineol	1182	0.28
17	kripton	1191	tr
18	α -terpineol	1189	3.07
19	mirtenol	1200	0.79
20	geraniol	1256	2.55
21	mirtenil acetat	1325	21.64
22	α -terpinil acetat	1355	1.36
23	neril acetat	1367	0.27
24	geranil acetat	1385	3.37
25	metileugenol	1406	0.84
26	(E)- β -kariofilen	1420	0.61
27	α -humulen	1460	1.54
28	biciklogermakren	1500	tr
29	spatulenol	1593	tr
	Ukupno identifikovanih komponenti	%	98.52

^a Retencioni indeks u odnosu na C9–C24 n-alkane na HP 5MS koloni; ^b relativni udeo u etarskom ulju; ^c tr-komponenta u tragu.

Kao što se može vidjeti iz tabele 5.2. u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Ulcinj dominiraju jedinjenja iz klase oksidovanih monoterpena koja su zastupljena u velikoj količini (78.39%). Kao dominantne komponente iz ove klase izdvajaju se: 1.8-cineol (25.68%), mirtenil acetat (21.64%) i linalol (10.05%). Od ostalih klasa terpenoida u etarskom ulju sa ovog lokaliteta, zastupljeni su u značajnoj količini i monoterpeni ugljovodonici (17.75%), sa α -pinenom kao dominantnom komponentnom (14.67%), seskviterpeni ugljovodonici (2.18%), kao i alifatična jedinjenja (1.92%).

Relativni udio pojedinih grupa terpenoida u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Ulcinj prikazan je na slici 5.3.



Slika 5.3. Osnovne klase jedinjenja (%) u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Ulcinj

b) Hemijski sastav etarskog ulja mirte sa lokaliteta Bar

U etarskom ulju mirte sa lokaliteta Bar identifikovano je 29 komponenti. Sve identifikovane komponente prikazane su u tabeli 5.3.

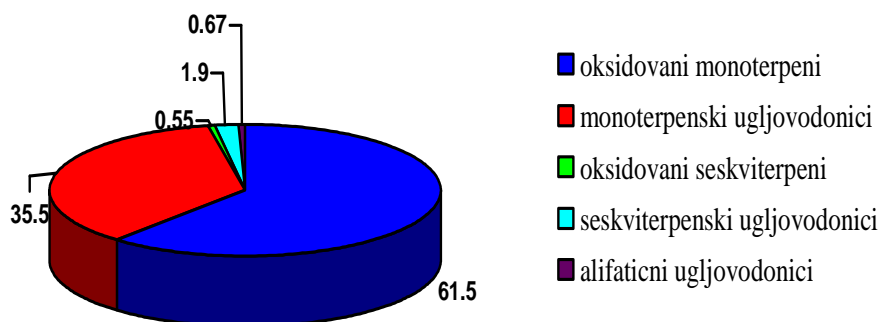
Tabela 5.3. Hemijski sastav etarskog ulja mirte sa lokaliteta Bar

Redni broj	Komponenta	KI ^a	% ^b
1	izobutil izobutirat	914	0.66
2	α -tujen	927	0.45
3	α -pinen	934	23.06
4	2- β -pinen	978	0.22
5	β -mircen	992	0.30
6	α -felandren	1006	0.51
7	δ -3-karen	1012	0.56
8	α -terpinen	1018	0.25
9	p-cimen	1026	1.52
10	limonen	1030	8.30
11	1.8-cineol	1032	21.86
12	(E)- β -ocimen	1049	0.84
13	γ -terpinen	1060	0.88
14	α -terpinolen	1090	0.98
15	linalol	1101	14.04
16	4-terpineol	1182	0.41
17	kripton	1191	0.34
18	α -terpineol	1189	2.98
19	mirtenol	1200	0.80

20	geraniol	1256	3.03
21	mirtenil acetat	1325	9.17
22	α -terpinil acetat	1355	0.85
23	neril acetat	1367	0.24
24	geranil acetat	1385	2.71
25	metileugenol	1406	1.24
26	(E)- β -kariofilen	1420	0.64
27	α -humulen	1460	1.23
28	biciklogermakren	1500	tr
29	spatulenol	1593	0.54
Ukupno identifikovanih komponenti		%	98.93

^a Retencioni indeks u odnosu na C9–C24 n-alkane na HP 5MS koloni; ^b relativni udeo u etarskom ulju; ^c tr-komponenta u tragu.

Podaci prikazani u tabeli 5.3. i na slici 5.4. pokazuju da su u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Bar najviše zastupljeni oksidovani monoterpeni (61.5%). Kao dominantne komponente iz ove klase izdvajaju se: 1.8-cineol (21.86%), linalol (14.04%) i mirtenil acetat (9.17%). Pored navedene grupe terpenoida u etarskom ulju ove vrste sa lokaliteta Bar zastupljeni su u značajnoj količini i monoterpeni ugljovodoni (35.5%) sa α -pinenom kao dominantnom komponentom (23.06%), zatim seskviterpeni ugljovodoni (1.9%), alifatična jedinjenja (0.67%) i oksidovani seskviterpeni (0.55%).



Slika 5.4. Osnovne klase jedinjenja (%) u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Bar

c) Hemijski sastav etarskog ulja mirte sa lokaliteta Budva

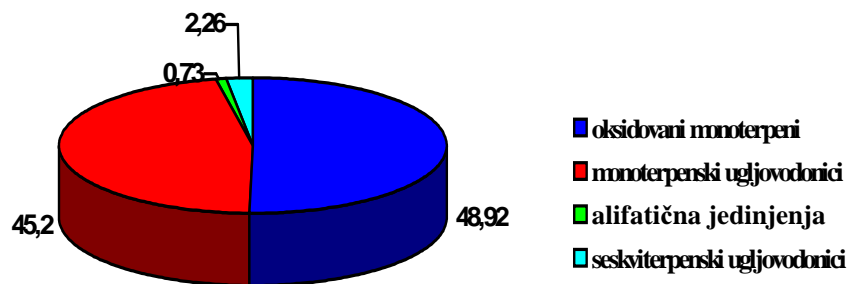
U etarskom ulju mirte sa lokaliteta Budva identifikovano je 29 komponenti. Sve identifikovane komponente prikazane su u tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Hemijski sastav etarskog ulja mirte sa lokaliteta Budva

Redni broj	Komponenta	KI ^a	% ^b
1	izobutil izobutirat	914	0.72
2	α -tujen	927	0.35
3	α -pinen	934	36.77
4	2- β -pinen	978	0.22
5	β -mircen	992	0.18
6	α -felandren	1006	0.24
7	δ -3-karen	1012	0.40
8	α -terpinen	1018	0.16
9	p-cimen	1026	0.69
10	limonen	1030	5.64
11	1,8-cineol	1032	25.46
12	(E)- β -ocimen	1049	0.28
13	γ -terpinen	1060	0.62
14	α -terpinolen	1090	0.70
15	linalol	1101	11.48
16	4-terpineol	1182	0.23
17	kripton	1191	tr
18	α -terpineol	1189	2.81
19	mirtenol	1200	0.52
20	geraniol	1256	1.82
21	mirtenil acetat	1325	2.66
22	α -terpinil acetat	1355	0.48
23	neril acetat	1367	0.16
24	geranil acetat	1385	2.29
25	metileugenol	1406	1.32
26	(E)- β -kariofilen	1420	0.67
27	α -humulen	1460	1.56
28	biciklogermakren	1500	tr
29	spatulenol	1593	tr
	Ukupno identifikovanih komponenti	%	98.73

^a Retencioni indeks u odnosu na C9–C24 n-alkane na HP 5MS koloni; ^b relativni udeo u etarskom ulju; ^c tr-komponenta u tragu.

Podaci prikazani u tabeli 5.4. i na slici 5.5. pokazuju da u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Budva dominiraju jedinjenja iz klase oksidovanih monoterpena koja su zastupljena u znatnoj količini (48.92%). Kao dominantne komponente iz ove klase izdvajaju se: 1,8-cineol (25.46%) i linalol (11.48%). Od ostalih klasa terpenoida u etarskom ulju sa ovog lokaliteta, zastupljeni su i monoterpenski ugljovodonici (45.2%), sa α -pinenom kao dominantnom komponentom (36.77%), seskviterpenski ugljovodonici (2.66%), kao i alifatična jedinjenja (0.73%).



Slika 5.5. Osnovne klase jedinjenja (%) u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Budva

d) Hemijski sastav etarskog ulja *Myrtus communis L.* sa lokaliteta Tivat

U etarskom ulju mirte sa lokaliteta Tivat identifikovano je ukupno 29 komponenti. Sve identifikovane komponente prikazane su u tabeli 5.5.

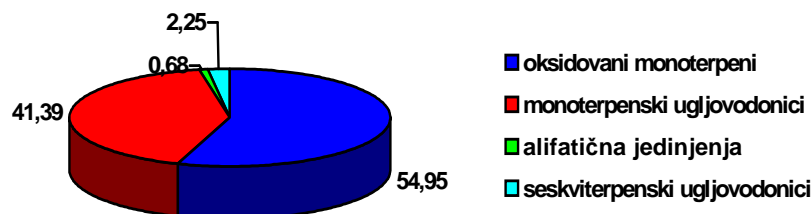
Tabela 5.5. Hemijski sastav etarskog ulja mirte sa lokaliteta Tivat

Redni broj	Komponenta	KI ^a	% ^b
1	izobutil izobutirat	914	0.67
2	α -tujen	927	0.33
3	α -pinen	934	34.86
4	2- β -pinen	978	0.23
5	β -mircen	992	0.19
6	α -felandren	1006	0.31
7	δ -3-karen	1012	0.41
8	α -terpinen	1018	0.25
9	p-cimen	1026	0.67
10	limonen	1030	3.37
11	1.8-cineol	1032	22.42
12	(E)- β -ocimen	1049	0.28
13	γ -terpinen	1060	0.68
14	α -terpinolen	1090	0.77
15	linalol	1101	11.04
16	4-terpineol	1182	0.27
17	kripton	1191	tr
18	α -terpineol	1189	3.15
19	mirtenol	1200	0.77
20	geraniol	1256	1.98
21	mirtenil acetat	1325	8.13
22	α -terpinil acetat	1355	0.62

23	neril acetat	1367	0.17
24	geranil acetat	1385	2.51
25	metileugenol	1406	1.14
26	(E)- β -kariofilen	1420	0.61
27	α -humulen	1460	1.60
28	biciklogermakren	1500	tr
29	spatulenol	1593	tr
	Ukupno identifikovanih komponenti	%	98.14

^a Retencioni indeks u odnosu na C9–C24 n-alkane na HP 5MS koloni; ^b relativni udeo u etarskom ulju; ^c tr-komponenta u tragu.

Kao što se može vidjeti iz tabele 5.5. i na slici 5.6. u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Tivat dominiraju jedinjenja iz klase oksidovanih monoterpena (54.95%). Kao dominantne komponente iz ove klase mogu se izdvojiti: 1.8-cineol (22.42%), linalol (11.04%) i mirtenil acetat (8.13%). Od ostalih klasa terpenoida u etarskom ulju sa ovog lokaliteta, zastupljeni su i monoterpeni ugljovodoni (41.39%), sa α -pinenom kao dominantnom komponentnom (34.86%), seskviterpeni ugljovodoni (2.25%), kao i alifatična jedinjenja (0.68%).



Slika 5.6. Osnovne klase jedinjenja (%) u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Tivat

e) Hemijski sastav etarskog ulja *Myrtus communis* L. sa lokaliteta Kotor

U etarskom ulju mirte sa lokaliteta Kotor, identifikovano je 29 komponenti. Sve identifikovane komponente prikazane su u tabeli 5.6.

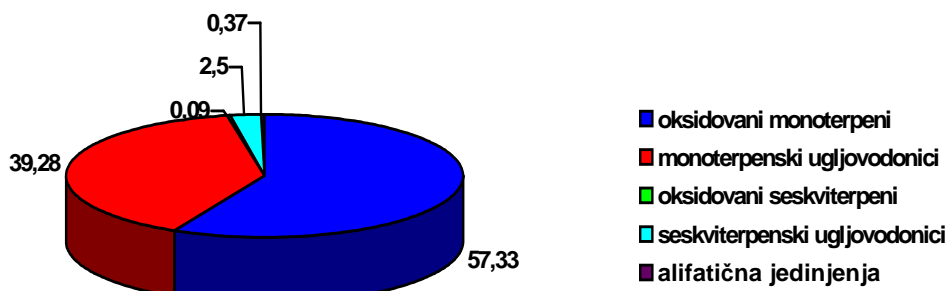
Tabela 5.6. Hemijski sastav etarskog ulja *Myrtus communis* L. sa lokaliteta Kotor

Redni broj	Komponenta	KI ^a	% ^b
1	izobutil izobutirat	914	0.37
2	α -tujen	927	0.30
3	α -pinen	934	33.63
4	2- β -pinen	978	0.25
5	β -mircen	992	0.24
6	α -felandren	1006	0.30
7	δ -3-karen	1012	0.31
8	α -terpinen	1018	0.17
9	p-cimen	1026	0.69
10	limonen	1030	2.78
11	1.8-cineol	1032	18.81
12	(E)- β -ocimen	1049	0.49
13	γ -terpinen	1060	0.61
14	α -terpinolen	1090	0.70
15	linalol	1101	16.13
16	4-terpineol	1182	0.23
17	kripton	1191	tr
18	α -terpineol	1189	2.64
19	mirtenol	1200	0.49
20	geraniol	1256	2.89
21	mirtenil acetat	1325	8.58
22	α -terpinil acetat	1355	0.76
23	neril acetat	1367	0.24
24	geranil acetat	1385	2.64
25	metileugenol	1406	1.23
26	(E)- β -kariofilen	1420	0.91
27	α -humulen	1460	1.56
28	biciklogermakren	1500	tr
29	spatulenol	1593	0.09
	Ukupno identifikovanih komponenti	%	98.45

^a Retencioni indeks u odnosu na C9–C24 n-alkane na HP 5MS koloni; ^b relativni udeo u etarskom ulju; ^c tr-komponenta u tragu.

Podaci prikazani u tabeli 5.6. i na slici 5.7. pokazuju da su u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Kotor najviše zastupljeni oksidovani monoterpeni (57.33%). Kao dominantne komponente iz ove klase mogu se izdvojiti: 1.8-cineol (18.81%), linalol (16.13%) i mirtenil acetat (8.58%). Pored navedene grupe terpenoida u etarskom ulju ove vrste sa lokaliteta Kotor zastupljeni su u nešto većoj količini i monoterpenski ugljovodonic (39.28%) sa α -pinenom kao dominantnom komponentom (33.63%) kao i ostale grupe

terpenoida: seskviterpensi ugljovodonici (2.5%), alifatična jedinjenja (0.37%) i oksidovani seskviterpeni (0.09%) koje su zastupljene u znatno manjim količinama.



Slika 5.7. Osnovne klase jedinjenja (%) u etarskom ulju mirte sa lokaliteta Kotor

f) *Hemijski sastav etarskog ulja Myrtus communis L. sa lokaliteta Herceg Novi*

U etarskom ulju mirte sa lokaliteta H. Novi identifikovano je 29 komponenti. Sve identifikovane komponente prikazane su u tabeli 5.7.

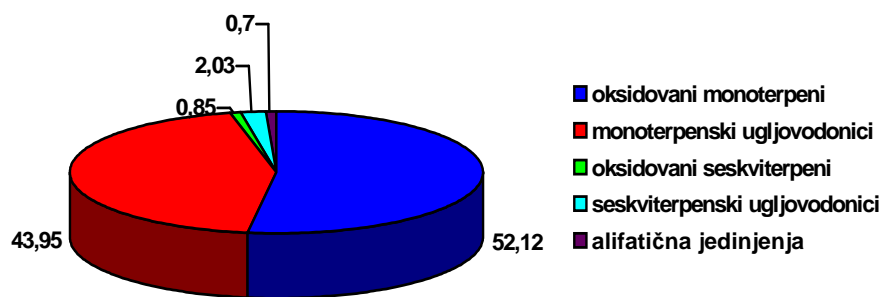
Tabela 5.7. Hemijski sastav etarskog ulja mirte sa lokaliteta Herceg Novi

Redni broj	Komponenta	KI ^a	% ^b
1	izobutil izobutirat	914	0.70
2	α -tujen	927	0.38
3	α -pinen	934	35.86
4	2- β -pinen	978	0.32
5	β -mircen	992	0.22
6	α -felandren	1006	0.32
7	δ -3-karen	1012	0.41
8	α -terpinen	1018	0.24
9	p-cimen	1026	1.15
10	limonen	1030	4.47
11	1.8-cineol	1032	23.91
12	(E)- β -ocimen	1049	0.32
13	γ -terpinen	1060	0.71
14	α -terpinolen	1090	0.76
15	linalol	1101	10.85
16	4-terpineol	1182	0.32
17	kripton	1191	0.16
18	α -terpineol	1189	2.78
19	mirtenol	1200	0.62

20	geraniol	1256	1.61
21	mirtenil acetat	1325	5.35
22	α -terpinil acetat	1355	0.53
23	neril acetat	1367	0.16
24	geranil acetat	1385	2.32
25	metileugenol	1406	1.04
26	(E)- β -kariofilen	1420	0.52
27	α -humulen	1460	1.29
28	biciklogermakren	1500	0.20
29	spatulenol	1593	0.84
Ukupno identifikovanih komponenti		%	98.68

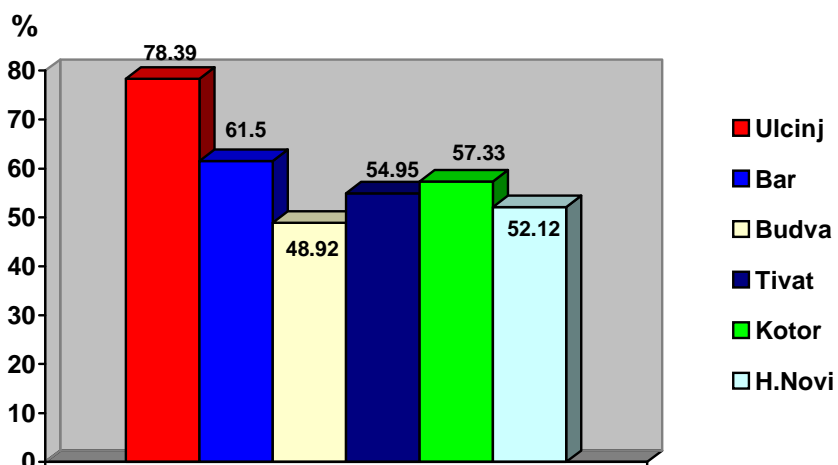
^a Retencioni indeks u odnosu na C9–C24 n-alkane na HP 5MS koloni; ^b relativni udeo u etarskom ulju; ^c tr-komponenta u tragu.

Kao što se može vidjeti iz tabele 5.7. i slike 5.8. u etarskom ulju mirte sa lokaliteta H. Novi dominiraju jedinjenja iz klase oksidovanih monoterpena (52.12%). Kao dominantne komponente iz ove klase izdvajaju se: 1.8-cineol (23.91%), linalol (10.85%) i mirtenil acetat (5.35%). Od ostalih klasa terpenoida u etarskom ulju sa ovog lokaliteta, zastupljeni su monoterpenski ugljovodoni (43.95%), sa α -pinenom kao dominantnom komponentom (35.86%), seskviterpenski ugljovodoni (2.03%), oksidovani seskviterpeni (0.85%), kao i alifatična jedinjenja (0.7%).



Slika 5.8. Osnovne klase jedinjenja (%) u etarskom ulju mirte sa lokaliteta H. Novi

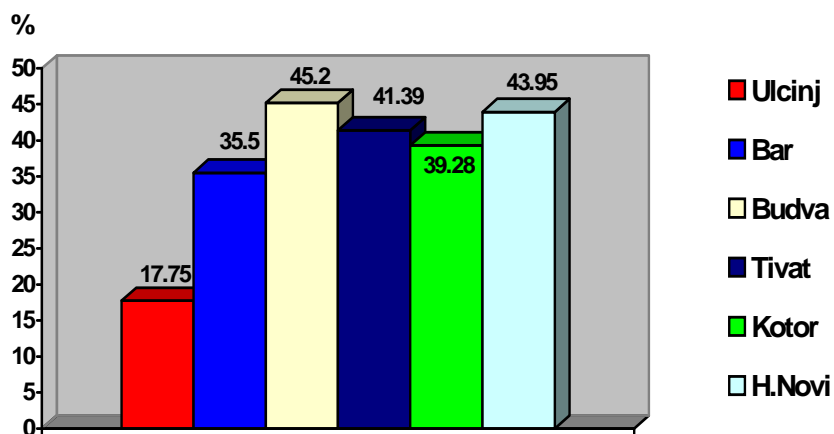
Uporednom analizom kvalitativnog i kvantitativnog sastava etarskog ulja mirte može se zaključiti da dominantnu grupu terpenoida u uzorcima sa svih šest lokaliteta čine oksidovani monoterpeni. Odnos količine oksidovanih monoterpena u ispitivanim uzorcima prikazan je na slici 5.9.



Slika 5.9. Odnos količine oksidovanih monoterpena u etarskim uljima mirte

Kao što se može videti sa slike, količina oksidovanih monoterpena u etarskim uljima mirte, približno je ista na većini lokaliteta i kreće se u rasponu od 48,92-61,5%, osim na lokalitetu Ulcinj gdje je zabilježena nešto veća vrijednost (78,39%).

Pored oksidovanih monoterpena, u etarskom ulju mirte prisutni su i monoterpeni ugljovodonici. Odnos količine monoterpenih ugljovodonika u ispitivanim uzorcima prikazan je na slici 5.10.

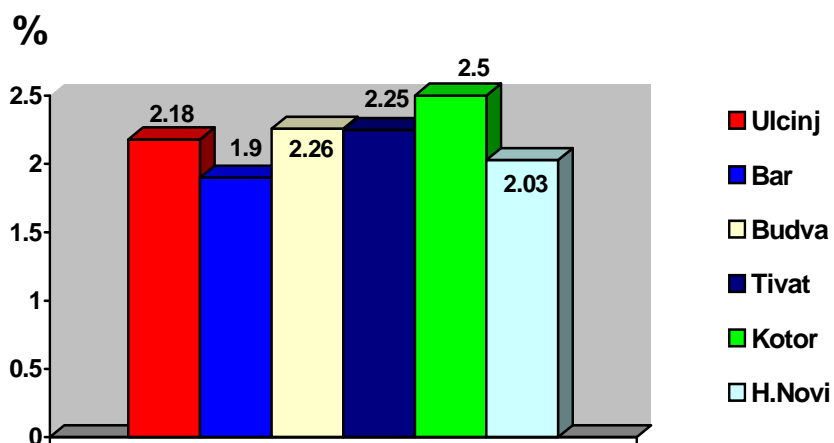


Slika 5.10. Odnos količine monoterpenih ugljovodonika u etarskim uljima mirte

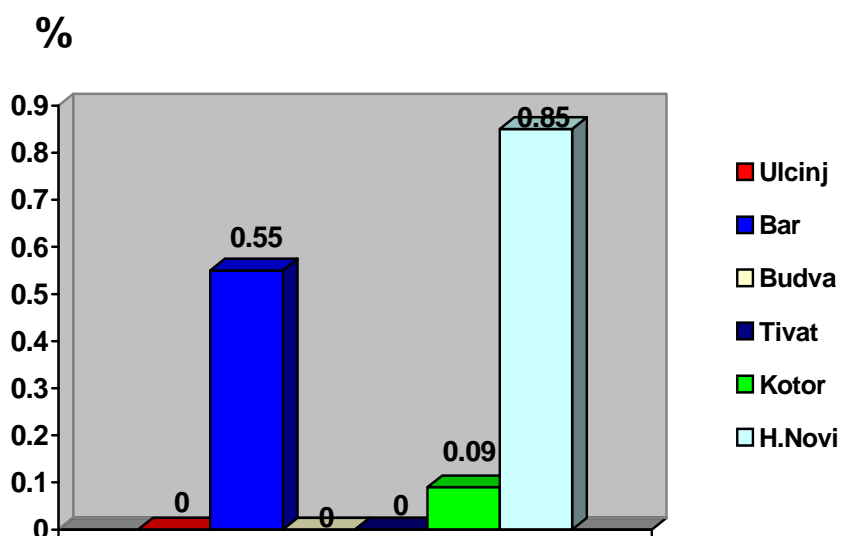
Količina monoterpenih ugljovodonika u ispitivanim uzorcima etarskih ulja mirte sa većine lokaliteta crnogorskog primorja, približno je ista, i kreće se od 35,5-45,2%, osim na lokalitetu Ulcinj gdje je zabilježena znatno manja vrijednost (17,75%).

Pored jedinjenja iz klase monoterpena, u ispitivanim uzorcima etarskih ulja mirte, prisutni su i seskviterpenoidi, ali u znatno manjoj količini. Među prisutnim seskviterpenskim jedinjenjima dominiraju seskviterpenski ugljovodonici (1,9-2,5%), dok su oksidovani seskviterpeni zastupljeni u minimalnoj količini (0,00-0,85%).

Odnos količine seskviterpenskih ugljovodonika u ispitivanim uzorcima prikazan je na slici 5.11., a oksidovanih seskviterpena na slici 5.12.

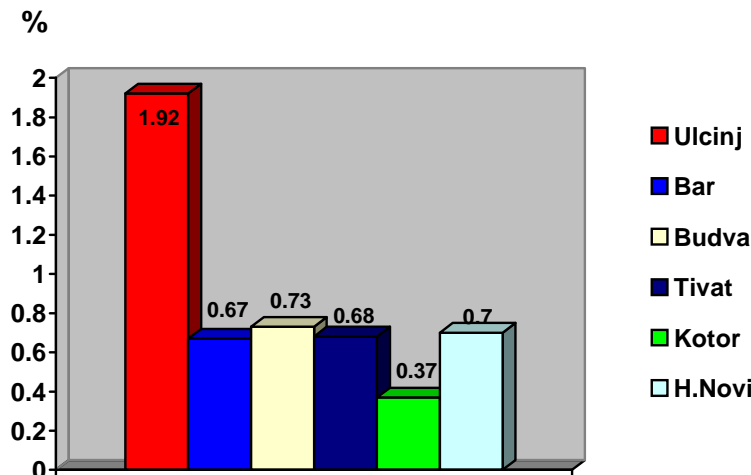


Slika 5.11. Odnos količine seskviterpenskih ugljovodonika u etarskim uljima mirte



Slika 5.12. Odnos količine oksidovanih seskviterpena u etarskim uljima mirte

Alifatična jedinjenja u etarskim uljima mirte, prisutna su u veoma malim količinama (0.37-1.92%). Odnos količine alifatičnih jedinjenja u etarskim uljima mirte sa različitih lokaliteta crnogorskog primorja prikazan je na slici 5.13.



Slika 5.13. Odnos količine alifatičnih jedinjenja u etarskim uljima mirte

Kao što se može vidjeti sa slike 5.13. količina alifatičnih jedinjenja u etarskim uljima mirte približno je jednaka na većini ispitivanih lokaliteta, osim na lokalitetu Ulcinj gdje je konstatovana znatno veća vrijednost.

Analizom prikazanih rezultata hemijskog sastava etarskih ulja mirte sa šest lokaliteta crnogorskog primorja, može se zaključiti da u kvalitativnom sastavu nema značajnijih razlika. Najveće razlike nađene su u sadržaju mirtenilacetata i α -pinena. S obzirom na sadržaj ova dva jedinjenja ističe se uzorak sa najjužnijeg lokaliteta crnogorskog primorja, Ulcinja, koji se može svrstati u poseban hemotip sa visokim sadržajem mirtenil acetata (21.64%) i malim sadržajem α -pinena (14.67%). Pored toga, treba istaći da se uzorak etarskog ulja mirte sa ovog lokaliteta karakteriše znatno većim sadržajem oksidovanih monoterpena i alifatičnih jedinjenja u odnosu na ostale uzorke, dok je količina monoterpenskih ugljovodonika značajno niža. Uzorak sa lokaliteta Budva ističe se po znatno nižem sadržaju mirtenil acetata (2.66%). Sumarno posmatrano u svim uzorcima etarskog ulja mirte dominiraju komponente iz klase oksidovanih monoterpena: 1,8-cineol (18.81-25.68%), linalol (10.05-16.13%), mirtenil acetat (2.66-21.64%), a od monoterpenskih ugljovodonika ističe se α -pinen kao kvantitativno najzastupljenija komponenta (14.67-36.77%).

Ranija istraživanja etarskog ulja mirte pokazuju da je sastav ulja u mnogome uslovljen geografskim porijeklom biljke (Lawrence, 1997). Najveća varijabilnost nađena je u sadržaju α -pinena (14.67% - 36.77 %) i mirtenil acetata (2.66 – 31.64%), dok je udio limonena, linalola i 1,8-cineola bio relativno konstantan u etarskim uljima ispitivanih uzoraka mirte. Na osnovu ove dvije veoma varijabilne komponente etarskog ulja mirte izvršena je i klasifikacija vrsta sa različitih geografskih podneblja u posebne hemotipove. Etarsko ulje mirte iz Španije karakteriše veoma visok sadržaj mirtenil acetata i nizak sadržaj α -pinena (Boelenes i Jimenez, 1991), dok su uzorci iz Maroka (Gauthier et al., 1988; Boelenes i Jimenez, 1991; Garry i Chalchat, 1992), Portugala (Frazao, 1974; Boelenes i Jimenez, 1991), Francuske (Gauthier et al., 1988), Albanije (Boelenes i Jimenez, 1991) i bivše Jugoslavije (Garry i Chalchat, 1992) imali visok sadržaj α -pinena i mirtenil acetata. Uzorci sakupljeni sa Crnogorskog primorja, svi izuzev uzorka iz okoline Ulcinja, pripadaju hemotipu koji karakteriše visok sadržaj bicikličnog monoterpenskog ugljovodonika α -pinena.

5.2. Hemijski sastav metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L.

Analize hemijskog sastava metanolnih ekstrakata mirte obuhvatale su:

- a) Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida;
- b) Hemijski skrining ekstrakata primjenom 2D-TLC;
- c) HPLC-DAD analiza fenolnih jedinjenja u ekstraktima.

5.2.1. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u metanolnim ekstraktima mirte

a) Sadržaj ukupnih fenola

Vrijednosti količine ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima mirte koje su određene po metodi Singleton et al., 1999. očitavane su sa grafika datog u prilogu (slika 8.47.) i izražene u mg/100 g ekstrakta, a rezultati su prikazani u tabeli 5.8. i u prilogu (tabela 8.47)

Tabela 5.8. Količina ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima mirte

Uzorak	Ukupni fenoli (mg/100 g)
<i>Myrtus communis</i> - Ulcinj	1,92
<i>Myrtus communis</i> - Bar	2,17
<i>Myrtus communis</i> - Budva	2,01
<i>Myrtus communis</i> - Tivat	2,01
<i>Myrtus communis</i> - Kotor	1,83
<i>Myrtus communis</i> – H. Novi	2,59

Iz tabele 5.8. se može vidjeti da su vrijednosti količine ukupnih fenola u ispitivanim uzorcima metanolnih ekstrakta približno iste na većini lokaliteta i kreću se od 1.83 do 2.17 mg/100 g ekstrakta, osim uzorka sa lokaliteta H. Novi gdje je utvrđena vrijednost 2.59 mg/100 g ekstrakta.

b) Sadržaj ukupnih flavonoida u metanolnim ekstraktima mirte

Vrijednosti količine ukupnih flavonoida u metanolnim ekstraktima mirte određene su po metodi Dowd-a, modifikovanoj po Arvouet-Grand et al., 1994. Vrijednosti količine ukupnih flavonoida su izražene u mg/100 g ekstrakta, a rezultati su prikazani u tabeli 5.9. i u prilogu (tabela 8.46; slika 8.46.).

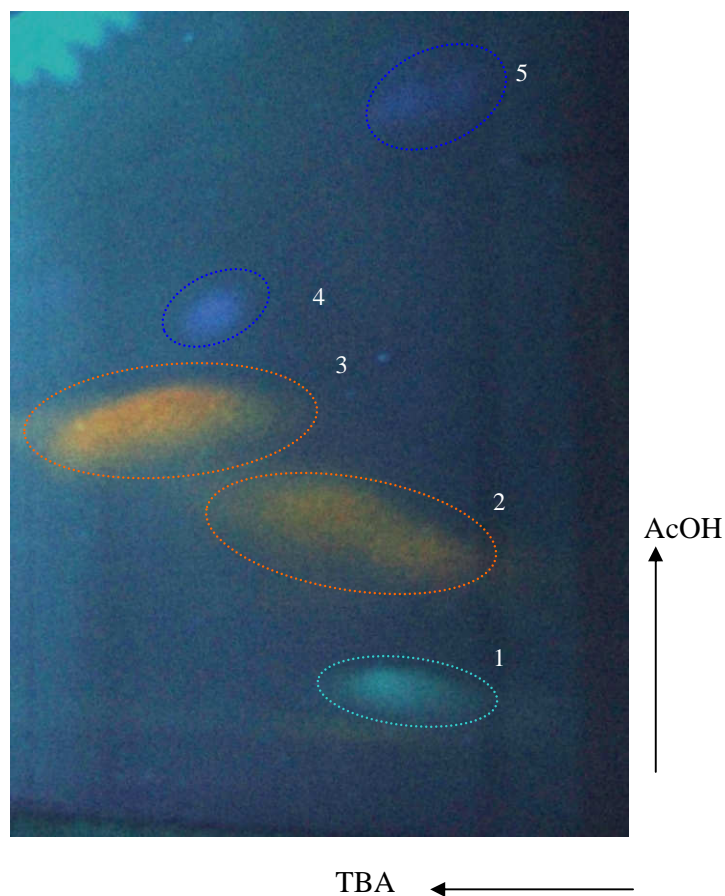
Tabela 5.9. Količina ukupnih flavonoida u metanolnim ekstraktima mirte

Uzorak	Ukupni flavonoidi (mg/100g)
<i>Myrtus communis</i> - Ulcinj	4,99
<i>Myrtus communis</i> - Bar	3,71
<i>Myrtus communis</i> - Budva	4,36
<i>Myrtus communis</i> - Tivat	4,32
<i>Myrtus communis</i> - Kotor	4,20
<i>Myrtus communis</i> – H. Novi	3,78

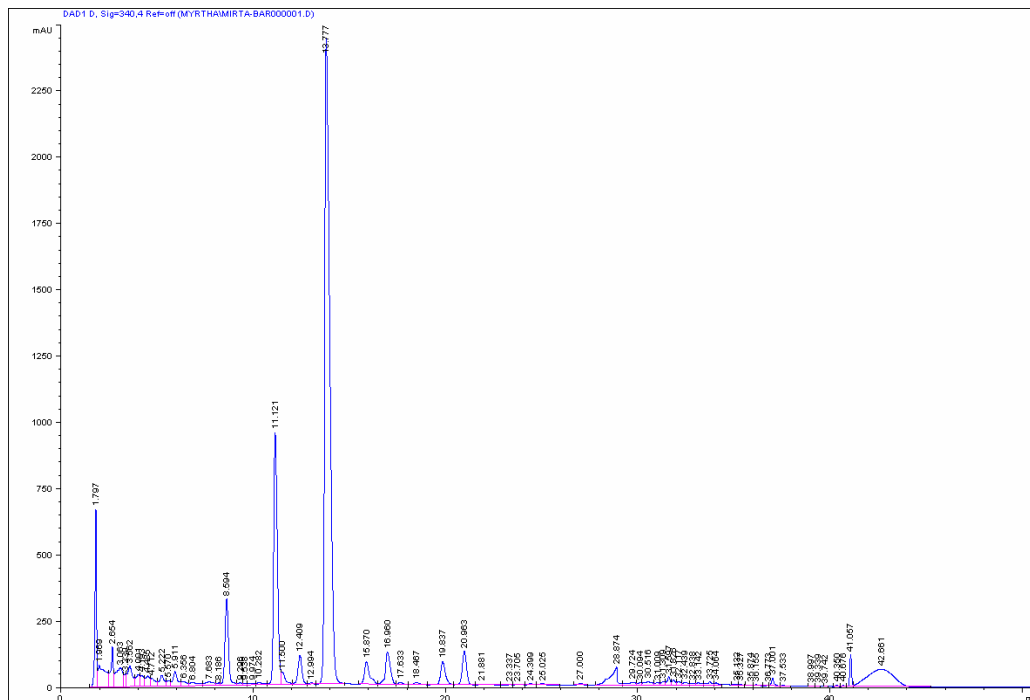
Kao što se može vidjeti iz tabele 5.9. vrijednosti količine ukupnih flavonoida u metanolnim ekstraktima mirte približno su iste na svim lokalitetima i kreću se od 3.71 do 4.36 mg/100 g ekstrakta. Nešto veća vrijednost količine ukupnih flavonoida nađena je u ispitivanom uzorku sa lokaliteta Ulcinj i iznosi 4.99 mg/100 g ekstrakta.

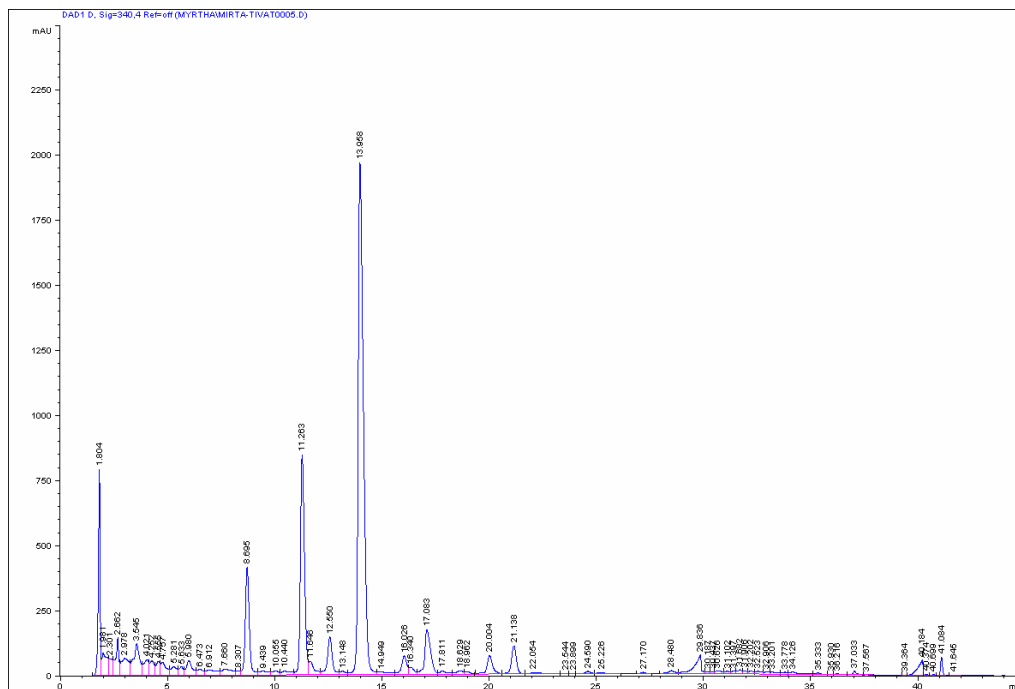
5.2.3. Dvodimenzionalna TLC (2D-TLC) analiza hemijskog sastava metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L.

2D TLC metoda je korišćena za preliminarni skrining metanolnih ekstrakata mirte. Dvodimenzionalni TLC hromatogram metanolnog ekstrakta mirte prikazan je na slici 5.14, a rezultati 2D TLC analize dati su u tabeli 5.10.

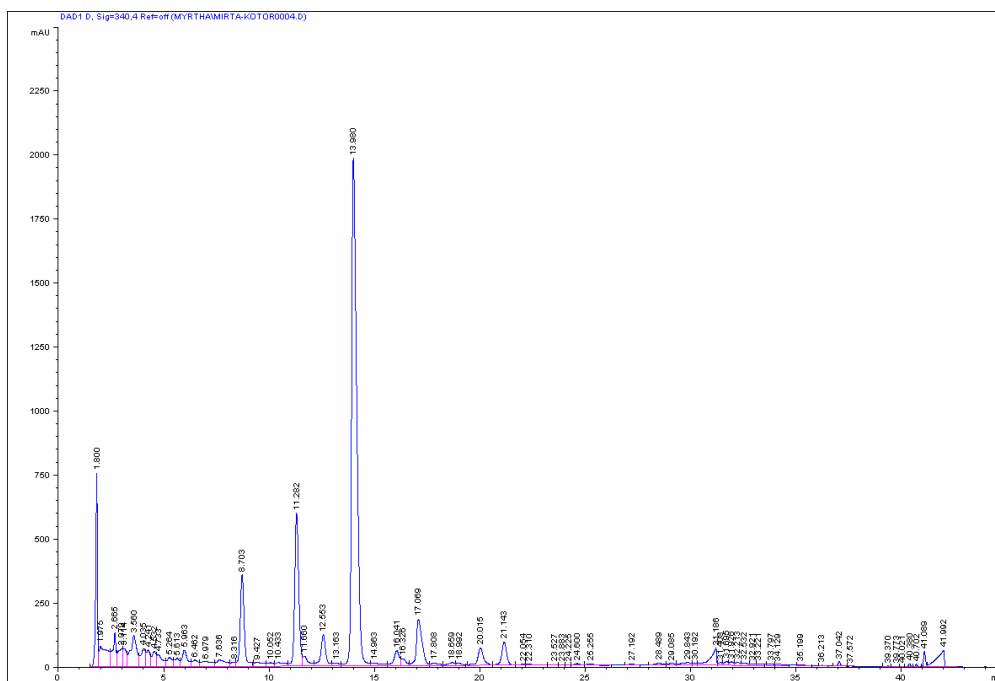


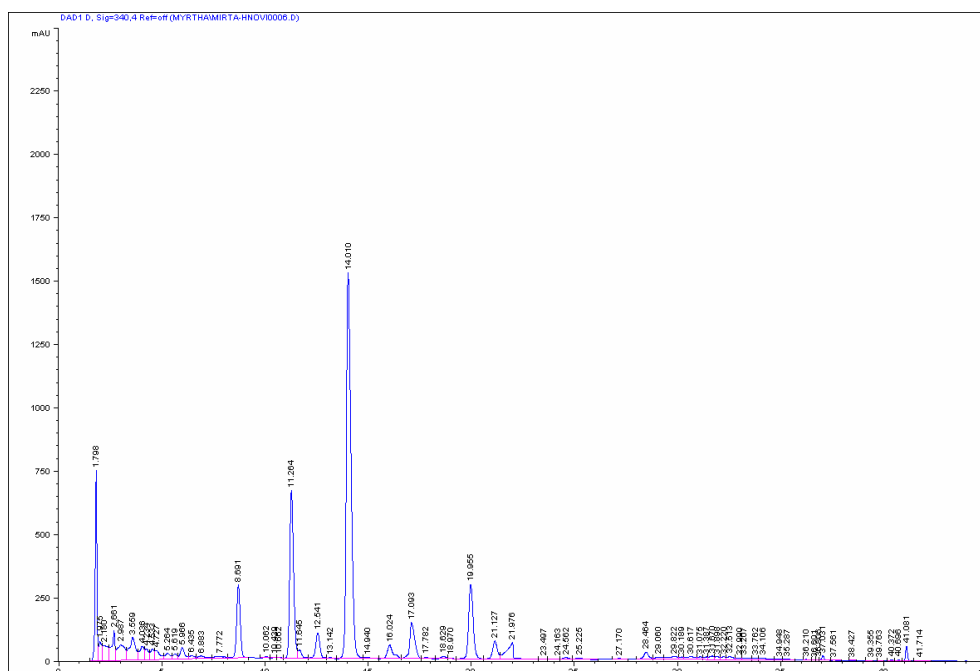
Slika 5.14. 2D TLC hromatogram metanolnog ekstrakta *Myrtus communis* L. na adsorbensu celuloza u sistemima razvijajača TBA i 15% AcOH nakon prskanja ploče narustof reagensom (UV 366nm).





Slika 5.18. HPLC-DAD hromatogram ekstrakta mirte sa lokaliteta Tivat





Slika 5.20. HPLC-DAD hromatogram ekstrakta mirte sa lokaliteta Herceg Novi

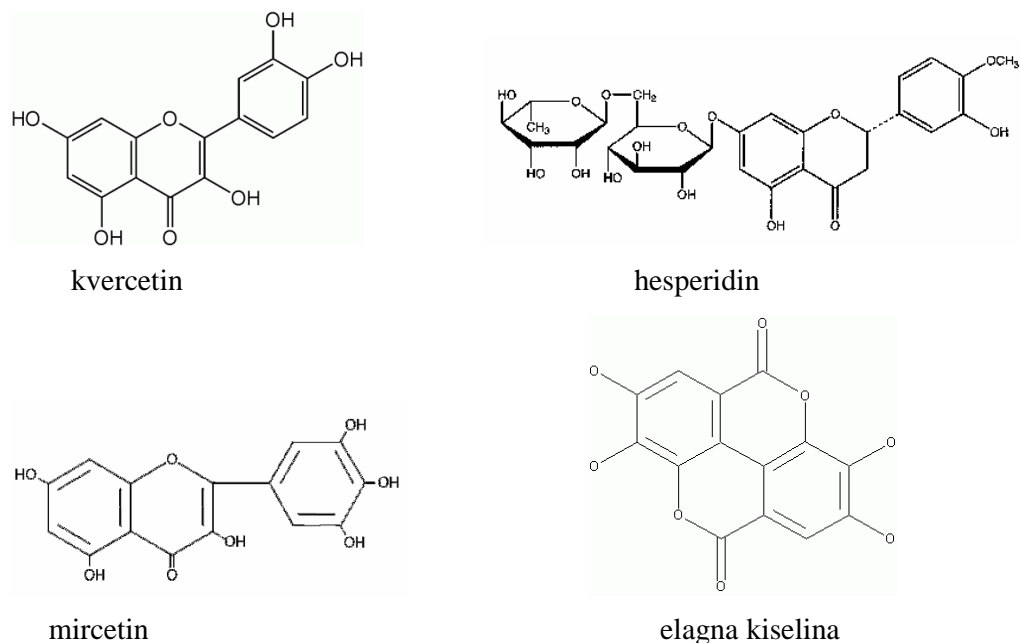
Rezultati HPLC-DAD analize metanolnih ekstrakata mirte prikazani su i u tabeli 5.11. UV-spektri nekih fenolnih jedinjenja mirte dobijeni u toku HPLC-DAD analize prikazani su u prilogu (slika 8.48.-8.53).

Tabela 5.11. Rezultati HPLC-DAD analize uzoraka metanolnih ekstrakata mirte

Rt	UV maksimumi (NM)*	KOMPONENTA
8.690	263.94; 293.58sh; 354.43	N.I.
11.276	259.07; 303.96sh; 356.15	Flavonol-7-O-diglukozid
12.503	259.07; 264.92sh; 293.31; 355.26	N.I.
14.023	260.78; 302.42sh; 350.69	Flavonol-3-O-monoglukozid
16.985	257,266sh,294sh,354	Rutin
17.090	252.74; 255.28sh; 303.72sh; 354.71sh	Elagna kiselina
19.916	253.50; 256.7sh; 303.4sh; 371.85;	Derivat kvercetina
21.113	256.28; 261.97sh; 349.66;	N.I.
28.450	254.66; 268.46sh, 297.69sh; 369.96	kvercetin

Korelacijom prikazanih rezultata 2D TLC i HPLC-DAD hromatografskih analiza uzoraka sa različitih lokaliteta može se zaključiti da ne postoje značajne kvalitativne razlike u hemijskom sastavu metanolnih ekstrakata. Pored toga može se uočiti da se metanolni ekstrakti mirte odlikuju visokim sadržajem fenolnih jedinjenja od kojih su dominantne komponente iz klase flavonoida, među kojima su identifikovani **rutin**,

flavonol-3-O-monoglikozidi i **flavonol-7-O-diglikozidi**. Sa hromatograma se vidi i značajno prisustvo fenolkarbonskih kiselina i njihovih derivata. Hromatografskom analizom, takođe je utvrđeno prisustvo **elagne kiseline** i njenih derivata, što ukazuje na vjerovatno prisustvo **taninskih komponenti** u uzorcima mirte. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima prema kojima su dominantna fenolna jedinjenja u mirti galaktozidi i glikozidi mircetina i kvercetina. Pored toga javljaju se i njihovi estri sa galnom kiselinom. Tako npr. Romai i sar. (2004) navode: mircetin-3,3-di-O-galaktozid, kvercetin-3-glikozid, hesperidin, Hinou i sar. (1988; 1989) mircetin-3-*beta*-D-6"-O-galoil-galaktozid, mircetin-3-galaktozid, mircetin-3-O-glukozid, mircetin-3-ramnoglukozid, Pichon i sar. (1993) hesperidin-2-O-CH₃-halkon-4-O-ramnoglukozid, flavonol-3-O-monoglikozidi, Joseph i sar. (1987) mircetin-3-ramnozid, mircetin-3-rutinozid, kvercetin, Twaij i sar. (1988a; 1988b) kvercetin 3-*beta*-D-6"-O-galoil-galaktozid, kvercetin-3-galaktozid, flavonol-7-O-diglikozidi, fenolkarbonske kiseline (hlorogenska, kafena, elagna), taninska jedinjenja, kao prisutne komponente u metanolnim ekstraktima mirte. Neka od jedinjenja koja su identifikovana u ekstraktima mirte data su na slici 5.21.



Slika 5.21. Fenolna jedinjenja mirte

5.3. Antioksidatne aktivnosti *Myrtus communis* L.

Antioksidatne aktivnosti uzoraka mirte ispitane su primjenom različitih *in vitro* testova. Ispitana je njihova sposobnost da neutrališu ili inhibiraju generisanje reaktivnih kiseoničnih radikala (DPPH, NO, OH i O²⁻), da inhibiraju lančane slobodno-radikalске reakcije lipidne peroksidacije (LP), kao i da inhibiraju aktivnost enzima ksantin oksidaze. Posebno je ispitivan antioksidantni potencijali terpenskih jedinjenja u etarskom ulju i fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima mirte.

5.3.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti etarskog ulja *Myrtus communis* L.

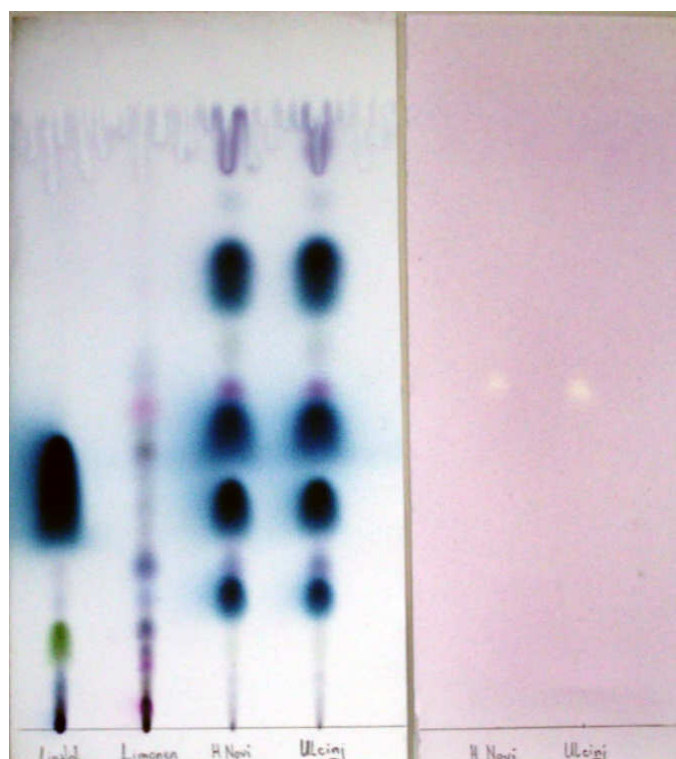
Antioksidantni potencijal etarskog ulja mirte ispitivan je praćenjem njihove sposobnosti da neutrališu stabilni N-centrirani DPPH-radikal. Za ova ispitivanja odabrana su etarska ulja dva uzorka mirte sa lokaliteta Ulcinj i Herceg Novi. Ovi uzorci su odabrani s obzirom na razlike u hemijskom sastavu etarskog ulja. Vrijednosti RSC (Radical Scavenging Capacity) izražene su kao IC₅₀ (koncentracija pri kojoj se postiže 50% inhibicije). Rezultati su prikazani u tabeli 5.12. i u prilogu (tabela 8.1. i 8.2; slika 8.1. i 8.2.). Kao pozitivna kontrola korišćeni su sintetski antioksidanti BHA, BHT i PG.

Tabela 5.12. Vrijednosti neutralizacije DPPH^{*} radikala IC₅₀ (µg/ml) etarskih ulja mirte i sintetskih antioksidanata.

Uzorak	Koncentracija (µL/mL)	Inhibicija (%)	IC ₅₀ (µL/mL)
Ulcinj	1.25	17.495	6.24
	2.50	25.156	
	5.00	44.456	
	10.00	67.292	
	15.00	85.119	
H. Novi	1.25	25.496	5.99
	2.50	30.844	
	5.00	47.257	
	10.00	63.117	
	15.00	72.706	
Standardni antioksidanti			IC₅₀ (µg/mL)
BHT			8.62
BHA			3.09
PG			0.42

Kao što se može vidjeti u tabeli 5.12. uzorci ispitivanih etarskih ulja mirte sa lokaliteta Ulcinj i H. Novi, pokazali su približno istu sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala. Bliske IC₅₀ vrijednosti neutralizacije DPPH[•] radikala za ova dva etarska ulja mirte mogu se objasniti time da dominantne komponente uzoraka ulja sa ova dva lokaliteta vjerovatno nisu nosioci antiradikalske aktivnosti. Kako se uzorci razlikuju u sadržaju mirtenilacetata može se zaključiti da ova komponenta nije odgovorna za antioksidantni efekat. Kod ispitivanih etarskih ulja može se uočiti koncentracijska zavisnost u antiradikalском djelovanju. Sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala ispitivanih etarskih ulja znatno je veća u poređenju sa ispitivanim komercijalnim antioksidantima.

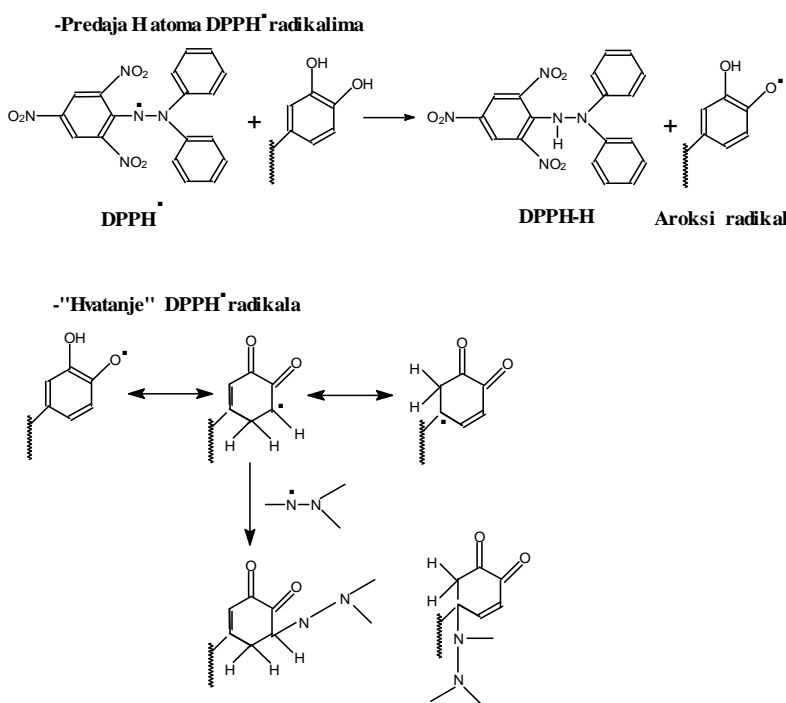
U cilju identifikacije komponenti odgovornih za DPPH[•]-RSC aktivnost, izvršena je takozvana „dot-blot“ analiza koja predstavlja kombinaciju TLC tehnike i DPPH testa, a rezultati DPPH-TLC analize ispitivanih etarskih ulja mirte sa lokaliteta Ulcinj i H. Novi prikazani su na slici 5.22.



Slika 5.22. DPPH-TLC hromatogrami etarskih ulja mirte sa lokaliteta H. Novi i Ulcinj, nakon prskanja reagensima vanilin-umporna kiselina (lijevo) i DPPH (desno).

Pojava žutih mrlja nakon prskanja ploča rastvorom DPPH objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da djeluju kao donori vodonika ili elektrona pri čemu DPPH radikal prelazi u redukovani, neutralni DPPH-H oblik. Ova reakcija praćena je i promjenom apsorbancije što se može uočiti promjenom boje iz ljubičaste u žutu. Iz literature je poznato da fenolna jedinjenja, pogotovo iz grupe flavonoida posjeduju sposobnosti „hvatanja” slobodnih radikala (Bors et al., 1990; Mimica-Dukić et al., 1994; Arora et al., 1998). Neutralizacija DPPH radikala fenolnim jedinjenjima može se objasniti pomoću dva mehanizma:

1. fenolno jedinjenje predaje H atom DPPH radikalima, pri čemu nastaje redukovani, neutralni DPPH-H oblik i ariloksi radikal koji je rezonantno stabilizovan;
2. ariloksi radikal može da reaguje sa još jednim DPPH radikalom pri čemu se kondenzuju i prelaze u neutralan molekul (slika 5.23).



Slika 5.23. Mehanizam antioksidantnog dejstva fenolnih jedinjenja na DPPH radikal

Analizom DPPH-TLC hromatograma prikazanog na slici 5.22., može se pretpostaviti da je u slučaju neutralizacije stabilnog DPPH[•] radikala, za antiradikalnu aktivnost etarskih ulja mirte najodgovorniji monoterpenski intramolekulski etar 1,8-

cineol koji je u etarskom ulju mirte zastupljen u značajnoj količini. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima koji se mogu naći u literaturi (Santos et al., 2004).

5.3.2. Antioksidantne aktivnosti metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L.

5.3.2.1. Određivanje neutralizacije DPPH[•] radikala

Rezultati spektrofotometrijskog očitavanja neutralizacije DPPH[•] radikala metanolnim ekstraktima mirte, kao i komercijalnim sintetskim antioksidantima BHA, BHT i PG, prikazani su u tabeli 5.13. i u prilogu (tabele 8.7- 8.15 i slike 8.7-8.15.).

Tabela 5.13. Neutralizacija DPPH[•] radikala (IC₅₀) metanolnim ekstraktima mirte i sintetskim antioksidantima BHA, BHT i PG.

Uzorak	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Myrtus communis</i> - Ulcinj	1,75
<i>Myrtus communis</i> – Bar	1,53
<i>Myrtus communis</i> – Budva	1,80
<i>Myrtus communis</i> – Tivat	2,03
<i>Myrtus communis</i> – Kotor	2,07
<i>Myrtus communis</i> – H. Novi	1,78
Standardni antioksidanti	IC ₅₀ (µg/ml)
BHA	2,02
PG	0,49
BHT	8,28

Kao što se može vidjeti iz tabele 5.13. najveću sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala pokazao je sintetski antioksidant PG (IC₅₀= 0.49 µg/ml). Metanolni ekstrakti mirte pokazali su približno istu vrijednost neutralizacije DPPH[•] radikala (IC₅₀= 1.53-2.07 µg/ml), koja je u nivou aktivnosti sintetskog antioksidanta BHA (IC₅₀= 2.02 µg/ml). Skevindžer aktivnost sintetskog antioksidanta BHT (IC₅₀= 8.28 µg/ml) bila je višestruko niža u odnosu na ispitivane metanolne ekstrakte mirte, posebno u odnosu na uzorak sa lokaliteta Bar, koji je pokazao najjaču aktivnost. Pojedina izolovana jedinjenja ekstrakata mirte, kao što je mircetin-3-*o*-ramnozid, pokazuju veoma visoku RSC- aktivnost na

neutralizaciju DPPH radikala, tako da je za ovo jedinjenje utvrđena IC_{50} vrijednost pri koncentraciji od 1.4 $\mu\text{g/ml}$ (Hyder et al., 2007).

5.3.2.2. Određivanje neutralizacije hidroksil radikala (OH^\bullet)

Hidroksil radikal je hemijski najreaktivniji oblik “aktiviranog kiseonika”, koji nastaje u toku univalentne redukcije molekulskog kiseonika i najodgovorniji je za citotoksične efekte kiseonika (Imlay i Linn, 1988). Poluživot mu je izuzetno kratak, jer odmah reaguje sa biomolekulima i praktično može napasti svaki molekul prisutan u živim ćelijama u reakciji ograničenoj difuzijom: šećere, amino-kiseline, fosfolipide, purinske i pirimidinske baze i organske kiseline lokalizovane manje od nekoliko nanometara od mjesta njegove produkcije (Hippeli i Elstner, 1999).

OH^\bullet “skevindžer” aktivnost metanolnih ekstrakata mirte određena je mjerenjem stepena degradacije 2-deoksi-D-riboze pod uticajem OH^\bullet radikala generisanog u Fentonovoj reakciji.

Rezultati neutralizacije OH^\bullet radikala metanolnim ekstraktima mirte (tabela 5.14) i prilog (tabele 8.16-8.21 i slike 8.16.-8.21.) izraženi su preko količine jednog od najvažnijih degradacionih produkata u procesima oksidacije deoksiriboze, malonildialdehida (MDA). Protektivni efekat metanolnih ekstrakata praćen je preko procenta inhibicije oksidativne degradacije dezoksiriboze. Kao pozitivna kontrola korišćeni su komercijalni sintetski antioksidanti BHT i BHA.

Tabela 5.14. Neutralizacija OH^\bullet radikala (IC_{50} - $\mu\text{g/ml}$) metanolnim ekstraktima mirte i sintetskim antioksidantima BHA i BHT.

Uzorak	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Myrtus communis</i> - Ulcinj	234,71
<i>Myrtus communis</i> – Bar	291,42
<i>Myrtus communis</i> – Budva	253,56
<i>Myrtus communis</i> – Tivat	305,71
<i>Myrtus communis</i> – Kotor	271,66
<i>Myrtus communis</i> – H. Novi	255,54
Standardni antioksidanti	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
BHA	29,87
BHT	28,16

Kao što se može vidjeti iz tabele 5.14. najveću sposobnost neutralizacije OH^\bullet radikala pokazao je sintetski antioksidant BHA (IC_{50} = 28.16 $\mu\text{g/ml}$). Metanolni ekstrakti mirte imali su približno iste vrijednosti neutralizacije OH^\bullet radikala (IC_{50} = 234.71-305.71 $\mu\text{g/ml}$), koja je bila znatno slabija u odnosu na primijenjenu pozitivnu kontrolu, odnosno komercijalne antioksidante BHA (IC_{50} = 29.87 $\mu\text{g/ml}$) i BHT (IC_{50} = 28.16 $\mu\text{g/ml}$).

5.3.2.3. Neutralizacija azot (II) oksida (NO^\bullet)

Inhibicija NO^\bullet radikala ekstraktima mirte veoma je značajna ukoliko joj dodamo i sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala. Naime, superoksid i azot-oksid radikal zajedničkom reakcijom daju peroksinitril anjon (ONOO^-) koji je veoma reaktivan. Nitrovanje fenola je jedan od ključnih momenata u aktivnosti ONOO^- . Npr. nitrovanje tirozina dovodi do disfunkcije enzima, a pored toga, povećane količine 3-nitro-tirozina nađene su u toku raznih patoloških stanja, kao što su inflamacija, Parkinson-ova bolest, Alzheimer-ova bolest i ateroskleroza (Groves, 1999). Iz tog razloga sprečavanje nastajanja nitro derivata tirozina, ujedno umanjuje mogućnost nastanka ovih oboljenja izazvanih oksidacionim stresom.

Rezultati spektrofotometrijskog očitavanja neutralizacije NO^\bullet radikala metanolnim ekstraktima mirte i komercijalnim sintetskim antioksidantima PG, BHT i BHA prikazani su u tabeli 5.15. i u prilogu (tabele 8.22.-8.28. i slike 8.22-8.30).

Tabela 5.15. Neutralizacija NO^\bullet radikala (IC_{50} - $\mu\text{g/ml}$) metanolnim ekstraktima mirte i sintetskim antioksidantima PG, BHA i BHT.

Uzorak	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Myrtus communis</i> - Ulcinj	794,56
<i>Myrtus communis</i> – Bar	961,92
<i>Myrtus communis</i> – Budva	536,87
<i>Myrtus communis</i> – Tivat	924,94
<i>Myrtus communis</i> – Kotor	939,68
<i>Myrtus communis</i> – H. Novi	894,63

Standardni antioksidanti	IC ₅₀ (µg/ml)
BHA	155,91
PG	18,21
BHT	724,82

Kao što se može vidjeti iz tabele 5.15. najveću sposobnost neutralizacije NO[•] radikala pokazao je sintetski antioksidant PG (IC₅₀= 18.21 µg/ml). Metanolni ekstrakti mirte pokazali su približno istu vrijednost neutralizacije DPPH[•] radikala (IC₅₀= 794.56-961.92 µg/ml), koja je u nivou aktivnosti sintetskog antioksidanta BHT (IC₅₀= 724.82 µg/ml). Najjaču skevindžer aktivnost pokazao je metanolni ekstrakt sa lokaliteta Budva (IC₅₀= 536.87 µg/ml). Ova vrijednost je približno dva puta jača u odnosu na ekstrakt sa lokaliteta Bar (IC₅₀= 961.92 µg/ml), a takođe i od pozitivne kontrole sintetskog antioksidanta BHT (IC₅₀= 724.82 µg/ml).

5.3.2.4. Neutralizacija superoksid anjon radikala (O₂^{•-})

Poznato je da u nekim enzimski katalizovanim reakcijama, kao proizvod nastaje i izvesna količina superoksid anjon radikala. Najveća količina superoksid anjon radikala u ćelijama potiče iz membranskih sistema pošto se vjerovatno produkuje u unutrašnjosti hidrofobnih bioloških membrana, s obzirom da je molekularni kiseonik rastvorljiviji u organskim rastvaračima (lipidnom sloju membrane) nego u vodenoj sredini. Sintetisan unutar membrane superoksid anjon radikal je vrlo toksičan, jer nukleofilnim atakom na karbonilne grupe estarskih veza između masnih kiselina i glicerola izaziva oštećenje fosfolipida membrane (Chan i Fishman, 1985). U reakciji sa vodonikom peroksidom, superoksid anjon radikal produkuje hidroksilni radikal (Haber-Weissova odnosno Fentonova reakcija) (Đorđević et al., 2000). Jedan od najznačajnijih enzima koji produkuje superoksid anjon radikal je ksantin oksidaza koja katalizuje transformacije hipoksantina u ksantin i ksantina u mokraćnu kiselinu.

Rezultati neutralizacije superoksid anjon radikala generisanog u sistemu ksantin/ksantin-oksidaza, metanolnim ekstraktima mirte i sintetskim antioksidantom PG prikazani su u tabeli 5.16. i u prilogu (tabele 8.39.-8.34. i slike 8.31-8.37.).

Tabela 5.16. Neutralizacija $O_2^{\cdot-}$ radikala (IC_{50} - $\mu\text{g/ml}$) metanolnim ekstraktima mirte i sintetskim antioksidantom PG

Uzorak	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Myrtus communis</i> - Ulcinj	0,287
<i>Myrtus communis</i> – Bar	0,723
<i>Myrtus communis</i> – Budva	0,438
<i>Myrtus communis</i> – Tivat	0,527
<i>Myrtus communis</i> – Kotor	0,751
<i>Myrtus communis</i> – H. Novi	0,667
Standardni antioksidanti	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
PG	0,063

Iz tabele 5.16. je evidentno da je najveću skevindžer aktivnost na superoksid anjon radikal pokazao ekstrakt mirte iz Ulcinja ($0.28 \mu\text{g/ml}$), a najslabiju uzorci sa lokaliteta Kotor ($0.75 \mu\text{g/ml}$) i Bar ($0.72 \mu\text{g/ml}$). U poređenju sa komercijalnim antioksidantom propilgalatom (PG) metanolni ekstrakti mirte pokazali su znatno slabiju sposobnost neutralizacije superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$).

5.3.2.5. Inhibicija enzima ksantin-oksidge

Rezultati spektrofotometrijskog očitavanja inhibicije enzima ksantin-oksidge metanolnim ekstraktima mirte prikazani su u tabeli 5.17.

Tabela 5.17. Uticaj metanolnih ekstrakata mirte i sintetskog antioksidansa PG na inhibiciju (IC_{50} - $\mu\text{g/ml}$) enzima ksantin oksidge

Uzorak	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Myrtus communis</i> - Ulcinj	0,333
<i>Myrtus communis</i> – Bar	0,626
<i>Myrtus communis</i> – Budva	0,535
<i>Myrtus communis</i> – Tivat	0,585
<i>Myrtus communis</i> – Kotor	0,608
<i>Myrtus communis</i> – H. Novi	0,308

Standardni antioksidanti	IC ₅₀ (µg/ml)
PG	0,061

Kao što se može videti iz tabele 5.17. najveći uticaj na inhibiciju enzima ksantin oksidaze pokazao je komercijalni sintetski antioksidans PG (IC₅₀= 0.061 µg/ml). Od ispitivanih metanolnih ekstrakata najjaču aktivnost ispoljio je uzorak mirte sa lokaliteta H.Novi (IC₅₀= 0.300 µg/ml). Sličnu aktivnost pokazao je i uzorak ove vrste sa lokaliteta Ulcinj (IC₅₀= 0.333 µg/ml). Znatno slabiju aktivnost na inhibiciju enzima ksantin oksidaze ispoljili su metanolni ekstrakti ove vrste sa lokaliteta: Budva (IC₅₀= 0.525 µg/ml), Tivat (IC₅₀= 0.566 µg/ml), Kotor (IC₅₀= 0.608 µg/ml) i Bar (IC₅₀= 0.626 µg/ml). U literaturi se mogu naći podaci o uticaju pojedinih komponenti ekstrakata mirte na inhibiciju enzima ksantin oksidaze. Dokazano je da mircetin-3-*o*-galaktozid i mircetin-3-*o*-ramnozid veoma efikasno inhibiraju aktivnost XOD tako da je pri koncentraciji od 100 µg/ml postignuta inhibicija od 57%, odnosno 59% (Hyder et al., 2007).

5.3.2.6. Određivanje uticaja metanolnih ekstrakata mirte na lipidnu peroksidaciju (LP)

S obzirom da je proces peroksidacije nezasićenih masnih kiselina osnovni uzrok oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana kao i svih ostalih bioloških sistema koji sadrže lipide (Halliwell i Gutteridge, 1985; Chatterjee i Agarwal, 1988), u ispitivanjima ukupne antioksidantne aktivnosti različitih supstanci potrebno je pored antiradikalnog djelovanja, ispitati i njihov uticaj na procese lipidne peroksidacije. U ispitivanjima uticaja ekstrakata mirte na intenzitet LP u lipozomima putem TBA-testa korišćen je Fe²⁺/askorbat sistem indukcije.

Rezultati uticaja ispitivanih uzoraka metanolnih ekstrakata mirte i komercijalnih antioksidanta BHT i PG na inhibiciju lipidne peroksidacije (%) u Fe²⁺/askorbat sistemu indukcije prikazani su u tabeli 5.18. i u prilogu (tabele 8.35.-8.42. i slike 8.38.-8.45.).

Tabela 5.18. IC₅₀ (µg/ml) vrijednosti inhibicije Fe²⁺/askorbat indukovane lipidne peroksidacije metanolnim ekstraktima mirte i komercijalnim antioksidantima BHT i PG

Uzorak	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Myrtus communis</i> - Ulcinj	100,97
<i>Myrtus communis</i> – Bar	79,89
<i>Myrtus communis</i> – Budva	96,46
<i>Myrtus communis</i> – Tivat	90,60
<i>Myrtus communis</i> – Kotor	95,45
<i>Myrtus communis</i> – H. Novi	72,53
Standardni antioksidanti	IC ₅₀ (µg/ml)
PG	17,23
BHT	3,43

Kao što se može vidjeti iz tabele 5.18. najveću sposobnost inhibicije Fe²⁺/askorbat indukovane lipidne peroksidacije pokazao je sintetski antioksidant BHT (IC₅₀= 3.43 µg/ml). Metanolni ekstrakti mirte pokazali su približno iste vrijednosti inhibicije Fe²⁺/askorbat indukovane lipidne peroksidacije (IC₅₀= 79.89-100.97 µg/ml), a koje su bile mnogo manje u odnosu na sintetske antioksidante primijenjene u ovom testu. Nešto veću sposobnost inhibicije Fe²⁺/askorbat indukovane lipidne peroksidacije u odnosu na druge lokalitete pokazao je metanolni ekstrakt mirte iz Herceg Novog (IC₅₀= 72.53 µg/ml). Među primijenjenim sintetskim antioksidantima najslabiju aktivnost pokazao je PG (IC₅₀= 17.23 µg/ml), ali je i ova vrijednost višestruko veća od najjačeg ispitivanog metanolnog ekstrakta mirte.

5.3.2.7. Određivanje ukupnog redukcionog potencijala metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (FRAP)

Rezultati određivanja redoks potencijala ekstrakata mirte prikazani su u tabeli 5.19. i izreženi su kao redoks ekvivalenti askorbinske kiseline. Kao standard za pravljenje kalibracione krive sa koje su očitavane vrijednosti ukupnog redukcionog potencijala metanolnih ekstrakata mirte, korišćeni su rastvori Fe²⁺ (0.00-83.3µmol/dm³) i askorbinske kiseline (0.00-19.61µmol/dm³). Kalibracione krive standardnih rastvora Fe²⁺ i askorbinske kiseline date su u prilogu (slike 8.48 i 8.49).

Na osnovu kalibracionih kriva standardnih rastvora Fe^{2+} i askorbinske kiseline izračunate su vrijednosti ukupnog redukcionog potencijala metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. koje su prikazane u tabeli 5.19.

Tabela 5.19. Vrijednosti ukupnog redukcionog potencijala ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) metanolnih ekstrakata mirte

Uzorak	Ukupni redukциони potencijal ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)
<i>Myrtus communis</i> – Ulcinj	2,28
<i>Myrtus communis</i> – Bar	1,92
<i>Myrtus communis</i> – Budva	3,00
<i>Myrtus communis</i> – Tivat	2,75
<i>Myrtus communis</i> – Kotor	2,50
<i>Myrtus communis</i> – H. Novi	2,72

Iz podataka prikazanih u tabeli 5.19. može se vidjeti da su metanolni ekstrakti mirte pokazali približno iste vrijednosti ukupnog redukcionog potencijala (2.28-2.75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Najmanju vrijednost redukcionog potencijala pokazao je metanolni ekstrakt ove vrste sa lokaliteta Bar (1.82 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), dok je najveća vrijednost konstatovana kod uzorka sa lokaliteta Budva (3.00 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Interesantno je da su uzorci sa juga Crne Gore (Bar i Ulcinj) imali značajno niže vrijednosti u odnosu na sjeverni region crnogorskog primorja (H. Novi, Budva, Tivat) što se može tumačiti uticajem geografskih faktora, prevashodno na hemijski sastav biljaka, a time i njihove biološke aktivnosti.

Upoređivanjem antioksidantne aktivnosti etarskih ulja i metanolnih ekstrakata mirte možemo konstatovati da su ekstrakti pokazali znatno jači antioksidantni potencijal. S obzirom na hemijski sastav metanolnih ekstrakata i etarskih ulja mirte može se zaključiti da fenolna jedinjenja ekstrakata pokazuju znatnu veću RSC aktivnost u odnosu na terpenaska jedinjenja – dominantne komponente etarskih ulja.

Generalno posmatrano, metanolni ekstrakti mirte pokazali su značajnu sposobnost neutralizacije stabilnog N-centriranog DPPH radikala u poređenju sa komercijalnim sintetskim antioksidantima BHA i BHT, kao i sposobnost neutralizacije NO radikala u odnosu na BHT. U ostalim antioksidantnim testovima (inhibicija OH i O^{2-} radikala, XOD i LP) metanolni ekstrakti mirte ispoljili su slabiju RSC aktivnost u odnosu na sintetske

antioksidanse. Treba istaći da je najjači antioksidantni potencijal ispoljio ekstrakt mirte sa lokaliteta Ulcinj, što se može povezati sa količinom ukupnih flavonoida, koja je u ovom uzorku znatno veća u odnosu na druge. Za mnoga jedinjenja iz ove grupe potvrđena je jaka antradikalska aktivnost (Mimica-Dukić i Božin, 2008; Ohshima et al., 1998; Jimenez i Garsia-Carmona, 1999; Pekkarinen et al., 1999; McDonald et al., 2001; Chun-Mao Lin et al., 2002). U referentnoj literaturi se mogu naći podaci o antioksidantnom potencijalu pojedinih komponenti metanolnih ekstrakata mirte. Dokazano je da mircetin-3-*o*-galaktozid i mircetin-3-*o*-ramnozid, pokazuju sposobnost inhibicije enzima ksantin oksidaze, lipidne peroksidacije i neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala (Hyder et al., 2007). Na osnovu navedenih podataka može se zaključiti da su pomenuta jedinjenja, uz sinergističko djelovanje sa drugim komponentama, nosioci antioksidantne aktivnosti metanolnih ekstrakata mirte.

5.4. Antibakterijska aktivnost ispitivanih etarskih ulja i ekstrakata *Myrtus communis* L.

Antibakterijsko djelovanje etarskih ulja i ekstrakata mirte ispitano je na 9 laboratorijskih sojeva Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija primjenom disk-difuzionog i MIC testa.

5.4.1. Antibakterijska aktivnost etarskih ulja *Myrtus communis* L.

5.4.1.1. "Disk difuzioni" test

Antibakterijska aktivnost etarskog ulja mirte ispitana je na devet odabranih bakterijskih sojeva koji su prikazani u tabelama 5.20; 5.21. i 5.22. Primjenjene koncentracije etarskih ulja, kao i antibiotici koji su korišćeni kao pozitivna kontrola, takođe su navedeni u istim tabelama. Antibakterijska aktivnost je ispitana na uzorcima etarskih ulja sa lokaliteta: Bar, Kotor i Herceg Novi. Lokalitete smo izabrali na osnovu međusobne udaljenosti istih.

Tabela 5.20. Rezultati "Disk-diffusion" testa etarskog ulja mirte sa lokaliteta Bar

Koncentracije ulja (µl/disku)	3.32	1.66	0.83	0.41	n-heksan	Antibiotik
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	26	12	9	(12)	0	Gentamicin 35
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20	(15)	(12)	0	0	Streptomycin 22
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	17	13	11	0	0	Streptomycin 27
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	18	14	11	0	0	Bacitracin 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(28)	(20)	(18)	(18)	0	Streptomycin 20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	Streptomycin 20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 9111	33	20	17	(10)	0	Hloramfenikol 19
<i>Escherichia coli</i> SY 252	(27)	(18)	(17)	0	0	Streptomycin 22
<i>Escherichia coli</i> lpca (IB 112)	32	23	21	17	0	Streptomycin 23

Svi rezultati u tabeli izraženi su u mm. Napomena: Podaci dati u zagradama označavaju da nije konstatovano baktericidno djelovanje već da je bakterijski tepih oko filter papira bio prorijeden, i jako stanjen, pa u ovom slučaju možemo govoriti o potencijalnom bakteriostatskom djelovanju etarskih ulja.

Tabela 5.21. Rezultati "Disk-diffusion" testa etarskog ulja mirte sa lokaliteta Kotor

Koncentracije ulja (µl/disku)	3.32	1.66	0.83	0.41	n-heksan	Antibiotik
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	26	17	13	0	0	Gentamicin 35
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16	(10)	(13)	0	0	Streptomycin 22
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	17	14	10	(12)	0	Streptomycin 27
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	28	13	11	0	0	Bacitracin 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25	(20)	(20)	17	0	Streptomycin 20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	Streptomycin 20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 9111	28	15	15	(13)	0	Hloramfenikol 19
<i>Escherichia coli</i> SY 252	(35)	(24)	(19)	0	0	Streptomycin 22
<i>Escherichia coli</i> lpca (IB 112)	30	25	20	(20)	0	Streptomycin 23

Svi rezultati u tabeli izraženi su u mm. Napomena: Podaci dati u zagradama označavaju da nije konstatovano baktericidno djelovanje već da je bakterijski tepih oko filter papira bio prorijeden, i jako stanjen, pa u ovom slučaju možemo govoriti o potencijalnom bakteriostatskom djelovanju etarskih ulja.

Tabela 5.22. Rezultati "Disk-diffusion" testa etarskog ulja mirte sa lokaliteta H.Novi

Koncentracije ulja (μ l/disku)	3.32	1.66	0.83	0.41	n- heksan	Antibiotik
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	20	13	11	0	0	Gentamicin 35
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	17	(15)	(14)	0	0	Streptomycin 22
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	15	12	10	(10)	0	Streptomycin 27
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	16	13	11	0	0	Bacitracin 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25	(27)	(16)	(18)	0	Streptomycin 20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	Streptomycin 20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 9111	29	18	(19)	(17)	0	Hloramfenikol 19
<i>Escherichia coli</i> SY 252	(26)	(18)	(27)	0	0	Streptomycin 22
<i>Escherichia coli</i> lpca (IB 112)	30	20	20	18	0	Streptomycin 23

Svi rezultati u tabeli izraženi su u mm. Napomena: Podaci dati u zagradama označavaju da nije konstatovano baktericidno djelovanje već da je bakterijski tepih oko filter papira bio prorijeđen, i jako stanjen, pa u ovom slučaju možemo govoriti o potencijalnom bakteriostatičkom djelovanju etarskih ulja.

Analizom rezultata prikazanih u tabelama 5.20; 5.21 i 5.22, može se vidjeti da je etarsko ulje mirte ispoljilo jaku antibakterijsku aktivnost na većinu ispitivanih sojeva. Posebno snažna antibakterijska aktivnost etarskog ulja mirte uočena je na sojevima: *K. pneumoniae*, *E. coli* lpca i *M. flavus*, kod kojih je pri koncentraciji od 3,32 μ l/disku utvrđena znatno veća zona inhibicije od primjenjenih antibiotika koji su korišćeni kao pozitivna kontrola. Slično dejstvo etarsko ulje mirte ispoljilo je i na bakterijskim sojevima *S. epidermidis* i *S. aureus*, gdje utvrđena zona inhibicije etarskog ulja pri istim koncentracijama približno odgovara pozitivnoj kontroli. Nešto slabije djelovanje etarskog ulja mirte uočeno je na soju *B. subtilis*, ali i kod ovog bakterijskog soja zone inhibicije su značajne. Kod bakterijskih sojeva *E. coli* (w.t.) i *E. coli* SY 252 nisu se mogle uočiti jasne inhibicione zone, već je bakterijski tepih oko diskova bio veoma prorijeđen, tako da ovde možemo govoriti samo o potencijalnom bakteriostatičkom djelovanju metanolnih ekstrakata mirte. Bakterijski soj *P. aeruginosa* se pokazao potpuno rezistentnim na sve primijenjene koncentracije etarskog ulja u ovom testu.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabelama 5.20, 5.21 i 5.22. može se zaključiti da etarska ulja mirte sa različitih lokaliteta crnogorskog primorja nisu pokazala značajne razlike u antibakterijskom djelovanju. S obzirom na rezultate "Disk difuzionog" testa dalja ispitivanja (MIC-test) rađena su na svim bakterijskim sojevima osim na *P. aeruginosa* koji je ispoljio potpunu rezistentnost i pri najvećim primjenjenim koncentracijama etarskog ulja.

5.4.1.2. MIC test

MIC test etarskog ulja mirte ispitan je na osam bakterijskih sojeva. MIC etarskog ulja tražen je u seriji dvostrukih razblaženja od 0,21 $\mu\text{l/ml}$ do 3,32 $\mu\text{l/ml}$, koja su odabrana na osnovu rezultata antibiogram testa. Rezultati MIC testa su prikazani u tabelama 5.23; 5.24 i 5.25.

Tabela 5.23. Rezultati MIC testa etarskog ulja mirte sa lokaliteta Bar

Koncentracija ulja ($\mu\text{l/ml}$)	3.32	1.66	0.83	0.42	0.21
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	-	-	-	+	+
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 9111	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> SY 252	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> lpca (IB 112)	-	-	-	-	+

Napomena: (-) u tabelli označava da nije došlo do rasta bakterija, odnosno da je konstatovan MIC. (+) u tabeli označava da je došlo do rasta bakterija.

Tabela 5.24. Rezultati MIC testa etarskog ulja mirte sa lokaliteta Kotor

Koncentracija ulja ($\mu\text{l/ml}$)	3.32	1.66	0.83	0.42	0.21
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	-	-	-	-	+
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 9111	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> SY 252	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> lpca (IB 112)	-	-	-	-	-

Napomena: (-) u tabelli označava da nije došlo do rasta bakterija, odnosno da je konstatovan MIC. (+) u tabeli označava da je došlo do rasta bakterija.

Tabela 5.25. Rezultati MIC testa etarskog ulja mirte sa lokaliteta Herceg Novi

Koncentracija ulja ($\mu\text{l/ml}$)	3.32	1.66	0.83	0.42	0.21
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	-	-	-	+	+
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 9111	-	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> SY 252	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> lpca (IB 112)	-	-	-	+	+

Napomena: (-) u tabelli označava da nije došlo do rasta bakterija, odnosno da je konstatovan MIC. (+) u tabeli označava da je došlo do rasta bakterija.

Na osnovu rezultata MIC testa može se zaključiti da su najveću osjetljivost na etarsko ulje mirte pokazali sledeći bakterijski sojevi: *E. coli* lpca, *K. pneumoniae*, *M. flavus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*. Za pomenute bakterijske sojeve MIC je konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 0,42 $\mu\text{l/ml}$. Znatno veću rezistentnost pokazali su bakterijski sojevi: *S. aureus* i *E. coli* (w.t.) gdje je MIC konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 3,32 $\mu\text{l/ml}$. Bakterijski soj *E. coli* SY 252 pokazao je potpunu rezistentnost tj. kod ovog bakterijskog soja MIC nije dostignut ni pri najvećim primijenjenim koncentracijama.

Iz prikazanih rezultata, može se primjetiti izvjesna razlika u antibakterijskom djelovanju etarskog ulja mirte sa različitim lokaliteta crnogorskog primorja. Tako na primjer, etarsko ulje mirte sa lokaliteta Kotor pokazalo je jače antibakterijsko dejstvo na sledeće bakterijske sojeve: *S. epidermidis*, *E. coli* lpca, *E. coli* (w.t.), i *B. subtilis*, u odnosu na uzorke sa druga dva lokaliteta. Razlike između lokaliteta se mogu objasniti različitim hemijskim sastavom etarskih ulja.

Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti etarskih ulja mirte iz Crne Gore uglavnom su slični sa podacima koji se mogu naći u referentnoj literaturi (Rasooli et al., 2002, Owlia et al., 2009; Yadegarinia et al., 2006; Bouzoita et al., 2003). Pomenuti autori su utvrdili snažno antibakterijsko djelovanje etarskih ulja ove vrste na sledećim

bakterijskim rodovima: *Bacillus*, *Bordetella*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina* i *Staphylococcus*, a kao komponentu odgovornu za antibakterijsko djelovanje navode monoterpenski ugljovodonik **α -pinen** koji je u etarskom ulju mirte zastupljen u količini od 23,06 do 35,86%, mada treba uzeti u obzir i sinergističko djelovanje ostalih komponenti. Takođe, treba istaći i to, da jedna od dominantnih komponenti etarskog ulja mirte **1,8-cineol** (18,81- 25,46%), pokazuje veoma slab antibakterijski potencijal (Ghalem et al., 2008).

5.4.2. Antibakterijska aktivnost metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L.

5.4.2.1. "Disk diffusion" test

Antibakterijska aktivnost metanolnih ekstrakata mirte ispitana je na 9 bakterijskih sojeva. U određivanju antibakterijske aktivnosti korišćeni su uzorci ekstrakata sa lokaliteta: Bar, Kotor i Herceg Novi. Lokaliteta su izabrani na osnovu međusobne udaljenosti istih. Rezultati "disk diffusion" testa dati su u tabelama 5.26, 5.27 i 5.28.

Tabela 5.26. "Disk-diffusion" test metanolnog ekstrakta mirte sa lokaliteta Bar

Koncentracija ekstrakta ($\mu\text{g/disku}$)	3.00	1.50	0.75	0.60	0.30	EtOH	Antibiotik
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	15	13	0	0	0	0	Gentamicin 35
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	24	22	18	20	16	0	Streptomycin 22
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	16	14	0	13	0	0	Streptomycin 27
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	16	13	0	(18)	0	0	Bacitracin 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(17)	0	0	0	0	0	Streptomycin 20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	(26)	(22)	(20)	(20)	(17)	0	Streptomycin 20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 9111	0	0	0	0	0	0	Hloramfenikol 19
<i>Escherichia coli</i> SY 252	(23)	(20)	(16)	(20)	(16)	0	Streptomycin 22
<i>Escherichia coli</i> IpcA (IB 112)	13	(18)	(16)	(18)	(16)	0	Streptomycin 23

Svi rezultati u tabeli izraženi su u mm. Napomena: Podaci dati u zagradama označavaju da nije konstatovano baktericidno djelovanje već da je bakterijski tepih oko filter papira bio prorijeden, i jako stanjen, pa u ovom slučaju možemo govoriti o potencijalnom bakteriostatičkom djelovanju ekstrakata.

Tabela 5.27. "Disk-diffusion" test metanolnog ekstrakta mirte sa lokaliteta Kotor

Koncentracija ekstrakta ($\mu\text{g/disku}$)	3.00	1.50	0.75	0.60	0.30	EtOH	Antibiotik
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	15	13	0	13	0	0	Gentamicin 35
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	26	25	16	20	16	0	Streptomycin 22
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	16	12	(20)	(16)	0	0	Streptomycin 27
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	16	14	0	(17)	0	0	Bacitracin 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(16)	0	0	0	0	0	Streptomycin 20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	(25)	(20)	(18)	(20)	(17)	0	Streptomycin 20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 9111	0	0	0	0	0	0	Hloramfenikol 19
<i>Escherichia coli</i> SY 252	(22)	(20)	(17)	(18)	(16)	0	Streptomycin 22
<i>Escherichia coli</i> IpcA (IB 112)	13	(22)	(17)	(18)	(16)	0	Streptomycin 23

Svi rezultati u tabeli izraženi su u mm. Napomena: Podaci dati u zagradama označavaju da nije konstatovano baktericidno djelovanje već da je bakterijski tepih oko filter papira bio prorijeden, i jako stanjen, pa u ovom slučaju možemo govoriti o potencijalnom bakteriostatičkom djelovanju ekstrakata.

Tabela 5.28. "Disc-diffusion" test metanolnog ekstrakta mirte sa lokaliteta Herceg Novi

Koncentracija ekstrakta ($\mu\text{g/disku}$)	3.00	1.50	0.75	0.60	0.30	EtOH	Antibiotik
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	15	14	0	(17)	0	0	Gentamicin 35
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	26	24	16	20	16	0	Streptomycin 22
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	16	14	(15)	0	0	0	Streptomycin 27
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	13	(17)	0	0	0	0	Bacitracin 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(18)	0	0	0	0	0	Streptomycin 20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	(27)	(23)	(17)	(20)	(15)	0	Streptomycin 20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB 9111	0	0	0	0	0	0	Hloramfenikol 19
<i>Escherichia coli</i> SY 252	(25)	(20)	(19)	(20)	(17)	0	Streptomycin 22
<i>Escherichia coli</i> IpcA (IB 112)	13	(18)	(16)	(17)	0	0	Streptomycin 23

Svi rezultati u tabeli izraženi su u mm. Napomena: Podaci dati u zagradama označavaju da nije konstatovano baktericidno djelovanje već da je bakterijski tepih oko filter papira bio prorijeden, i jako stanjen, pa u ovom slučaju možemo govoriti o potencijalnom bakteriostatičkom djelovanju ekstrakata.

Na osnovu rezultata "Disc diffusion" testa može se zaključiti da su metanolni ekstrakti mirte ispoljili dejstvo na sve bakterijske sojeve osim na *K. pneumoniae* koji je ispoljio potpunu rezistentnost i pri najvećim primjenjenim koncentracijama etarskog ulja.

Najjače antibakterijsko dejstvo ekstrakti mirte su ispoljili na sojeve: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis* i *M. flavus*. Ovo se može objasniti činjenicom da se radi o gram-pozitivnim bakterijama kroz čiji ćelijski zid hidrofilni ekstrakti lakše difunduju za razliku od gram-negativnih bakterija. Značajno je naglasiti da su ekstrakti mirte pokazali bakteriostatičko dejstvo i na, inače jako rezistentnom soju, *P. aeruginosa*. Kod sva tri testirana soja *E. coli* bakterijski tepih oko filter papira bio je jako prorijeđen pa ovde možemo govoriti samo o potencijalnom bakteriostatičkom djelovanju ekstrakata mirte.

5.4.2.2. MIC test

Na osnovu rezultata "Disc diffusion" testa, MIC test metanolnih ekstrakata mirte urađen je na osam bakterijskih sojeva. Rezultati MIC testa prikazani su u tabelama 5.29, 5.30. i 5.31.

Tabela 5.29. MIC test metanolnog ekstrakta mirte sa lokaliteta Bar

Koncentracije ekstrakta (µg/ml)	32.0	18.0	9.0	4.50
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	-	-	-	+
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> SY 252	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> Ipca (IB 112)	-	-	+	+

Napomena: (-) u tabelli označava da nije došlo do rasta bakterija, odnosno da je konstatovan MIC. (+) u tabeli označava da je došlo do rasta bakterija.

Tabela 5.30. MIC test metanolnog ekstrakta mirte sa lokaliteta Kotor

Koncentracije ekstrakta (µg/ml)	32.0	18.0	9.0	4.50
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	-	-	-	+
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> SY 252	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> lpca (IB 112)	-	-	+	+

Napomena: (-) u tabelli označava da nije došlo do rasta bakterija, odnosno da je konstatovan MIC.
(+) u tabeli označava da je došlo do rasta bakterija.

Tabela 5.31. MIC test metanolnog ekstrakta mirte sa lokaliteta Herceg Novi

Koncentracije ekstrakta (µg/ml)	32.0	18.0	9.0	4.50
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10774	-	-	-	+
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> SY 252	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> lpca (IB 112)	-	-	+	+

Napomena: (-) u tabelli označava da nije došlo do rasta bakterija, odnosno da je konstatovan MIC.
(+) u tabeli označava da je došlo do rasta bakterija.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabelama 5.29; 5.30. i 5.31. može se zaključiti da je, od ukupno osam testiranih bakterijskih sojeva, za šest konstatovan MIC. MIC nije

konstatovan za bakterijske sojeve *E. coli* (w.t.) i *E. coli* SY 252, ni pri najvećim primijenjenim koncentracijama ekstrakta mirte (32.0 µg/ml). Dok je MIC za *S. epidermidis* i *M. flavus* utvrđen je pri koncentraciji ekstrakta nižoj od 4.5 µg/ml.

Takođe, se može zaključiti da u antibakterijskoj aktivnosti između uzoraka metanolnih ekstrakata mirte sa različitih lokaliteta nema značajnijih razlika. Dobijeni rezultati su, uglavnom, u skladu sa rezultatima koji se mogu naći u dostupnoj referentnoj literaturi i koji potvrđuju snažno antibakterijsko djelovanje metanolnih ekstrakata mirte (Shaheen et al., 2006; DeLaurentis et al., 2005; Yadegarinia et al. 2006; Bouzouita et al., 2003; Mansouri et al., 2001; Dorman i Deans 2000; Ilcin i Digrak, 1998; Sacchetti et al., 2007). Mehanizam antibakterijskog djelovanja etarskih ulja i biljnih ekstrakata nije do kraja razjašnjen, ali se može pretpostaviti da ova jedinjenja svoju aktivnost ostvaruju, prvenstveno inhibicijom funkcija ćelijske membrane, inhibicijom aktivnosti različitih enzimskih sistema i djelovanjem na genetski materijal bakterija (Shaheen et al., 2006). Međutim, u većini slučajeva, mehanizam djelovanja ispitivanih supstanci na testirane sojeve još uvek nije poznat i zahtijeva dodatna istraživanja.

5.5. Antimutagena aktivnost *Myrtus communis* L.

Za određivanje antimutagenog potencijala etarskih ulja i ekstrakata mirte korišćen je reverzni test na bakterijskom soju *E. coli* IC202 koji je deficitaran za OxyR protein. OxyR protein je redoks senzitivni transkripcioni aktivator, koji reguliše ekspresiju OxyR regulona, u kome je locirano 9 gena koji kodiraju antioksidativne enzime: katalazu, hidroperoksidazu I, alkil hidroperoksid reduktazu, glutation reduktazu i dr (Urios et al., 1995; Blanco et al., 1998; Aslund et al., 1999; Sota et al., 2006). Usled nemogućnosti indukcije odbrambenog sistema nakon primene oksidanta ispoljava se hiperosetljivost soja na oksidativna oštećenja (Nikolić, 2004).

5.5.1. Antimutagena aktivnost etarskih ulja *Myrtus communis* L.

Za preliminarno ispitivanje toksičnosti etarskih ulja mirte na testirane bakterijske sojeve *E. coli* IC185 i *E. coli* IC202 korišćen je "spot" test. Ovim testom utvrđene su najniže netoksične koncentracije etarskih ulja mirte, koje su korišćenje u određivanju

antimutagene aktivnosti. Takođe je ispitana toksičnost korišćenog rastvarača n-heksana. Rezultati “spot” testa prikazani su u tabelama 5.32, 5.33. i 5.34.

Tabela 5.32. Rezultati ispitivanja toksičnosti etarskog ulja mirte sa lokaliteta Bar i n-heksana na bakterijskim sojevima *E. coli* IC185 i *E. coli* IC202

Bakterijski soj	Tip testa	Primijenjene koncentracije (µl/disku)					Kontrola (n-heksan) 1.6
		0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	
<i>E.coli</i> IC202	Filter papir	0	10	18.5	21	27	0
	Bunarčići	0	13	17	20	28	0
<i>E.coli</i> IC185	Filter papir	0	11.3	16	20	30	0
	Bunarčići	0	12	15.5	26.7	32	0

Napomena: prečnik zone inhibicije izražen je u mm

Tabela 5.33. Rezultati ispitivanja toksičnosti etarskog ulja mirte sa lokaliteta Kotor i n-heksana na bakterijskim sojevima *E. coli* IC185 i *E. coli* IC202

Bakterijski soj	Tip testa	Primijenjene koncentracije (µl/disku)					Kontrola (n-heksan) 1.6
		0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	
<i>E.coli</i> IC202	Filter papir	0	15	19	22	26	0
	Bunarčići	0	13	16.5	20	25	0
<i>E.coli</i> IC185	Filter papir	0	16	18	22	27	0
	Bunarčići	0	13	18	21	25	0

Napomena: prečnik zone inhibicije izražen je u mm

Tabela 5.34. Rezultati ispitivanja toksičnosti etarskog ulja mirte sa lokaliteta Herceg Novi i n-heksana na bakterijskim sojevima *E. coli* IC185 i *E. coli* IC202

Bakterijski soj	Tip testa	Primijenjene koncentracije (µl/disku)					Kontrola (n-heksan) 1.6
		0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	
<i>E.coli</i> IC202	Filter papir	0	11	16	20	31	0
	Bunarčići	0	12	17	22	29	0
<i>E.coli</i> IC185	Filter papir	0	18	20	26	29	0
	Bunarčići	0	13	17	21	28	0

Napomena: prečnik zone inhibicije izražen je u mm

Iz rezultata ispitivanja toksičnosti etarskog ulja mirte prikazanih u tabelama 5.32, 5.33. i 5.34. može se vidjeti da su za etarska ulja mirte sa sva tri lokaliteta utvrđene najniže netoksične koncentracije u opsegu od 0.1-0.2 $\mu\text{l}/\text{disku}$, tako da su za dalja ispitivanja antimutagene aktivnosti korišćene koncentracije etarskog ulja koje su niže od utvrđenih najnižih netoksičnih koncentracija.

Rezultati određivanja antimutagenog efekta etarskog ulja mirte na spontanu i t-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202 dati su u tabeli 5.35. kao i na slici 5.24.

Tabela 5.35. Antimutageni efekat etarskog ulja *M. communis* L. na spontanu i t-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202

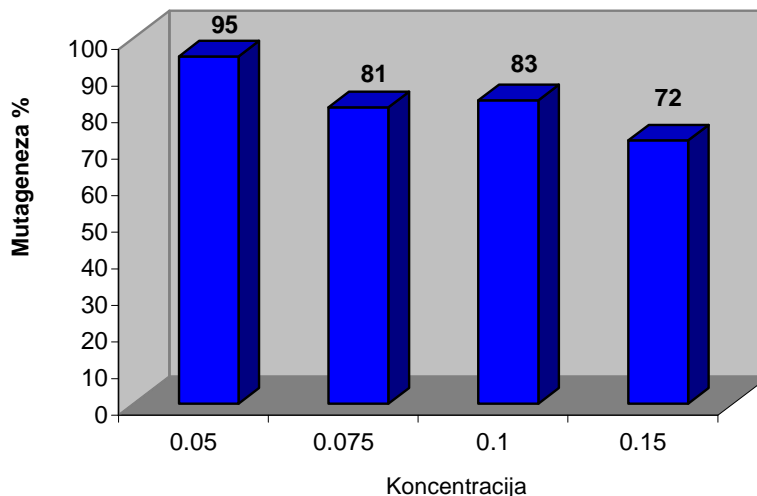
Koncentracija ($\mu\text{l}/\text{p}$)	- t-BOOH		+ t-BOOH ¹	
	Trp ⁺ /p ²	Mutageneza ³ (%)	Trp ⁺ /p	Mutageneza (%)
0	104 \pm 6	-	182 \pm 3	-
n-heksan	97 \pm 16	100	196 \pm 13	100
0.05	92 \pm 17	94	187 \pm 17	95
0.075	101 \pm 20	104	159 \pm 7	81
0.1	88 \pm 15	90	163 \pm 22	83
0.15	85 \pm 14	87	142 \pm 17	72

¹ Koncentracija t-BOOH je 25 $\mu\text{g}/\text{p}$

² Trp⁺/p (Trp⁺/ml = Trp⁺/p x 10)

³ Procenat mutageneze (računato u odnosu na n-heksan kao kontrolu)

* p \leq 0.05



Slika 5.24. Antimutageni efekat etarskog ulja *M. communis* L. na t-BOOH indukovanu mutagenozu u *E. coli* IC202

Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti etarskog ulja mirte na inhibiciju lipidne peroksidacije (LP) i neutralizaciju DPPH radikala, pokazuju značajan antioksidativni potencijal. S obzirom na hemijski sastav etarskog ulja mirte može se zaključiti da je antioksidantna aktivnost, vezana za **α -pinen** i **limonen** kao dominantne komponente, mada se mora uzeti u obzir i sinergističko djelovanje ostalih komponenti.

Imajući u vidu povezanost antioksidante i antimutagene aktivnosti, možemo zaključiti da je etarsko ulje mirte ispoljilo značajan antimutageni potencijal (u okviru netoksičnih koncentracija), koji se najvjerojatnije zasniva na antioksidantnoj aktivnosti njegovih komponenti. Prethodna istraživanja molekularnih mehanizama antimutagenog dejstva etarskih ulja i njihovih konstituenata – **linalola**, **α - i β -tujona** i **1,8-cineola** su pokazala da se njihov antimutageni potencijal u velikoj mjeri zasniva na povećanju efikasnosti ekscizione reparacije (Berić-Bjedov, 2006). Ispitivanja antimutagene aktivnosti pojedinačnih komponenti etarskih ulja kao što su **mircen**, **linalol** i **1,8-cineol**, pokazali su da mircen i linalol posjeduju znatno veći antimutageni potencijal u odnosu na 1,8-cineol (Mitić-Ćulafić et al., 2009). Imajući u vidu da je 1,8-cineol dominantna komponenta etarskog ulja mirte, kao i pomenute rezultate, može se zaključiti da ovo jedinjenje nije nosilac antimutagene aktivnosti etarskog ulja mirte. Uzimajući u obzir da su bakterijske ćelije tretirane istovremeno sa antioksidantima (etarsko ulje) i mutagenom

(t-BOOH), može se pretpotaviti da je redukcija mutageneze povezana sa skevindžer aktivnošću na ROS ili direktnom interakcijom sa t-BOOH.

Sa grafika se može vidjeti da se sa povećanjem koncentracije etarskog ulja smanjuje procenat mutageneze, odnosno povećava antimutageni efekat

5.5.2. Antimutagena aktivnost ekstrakata *Myrtus communis* L

Za preliminarno ispitivanje toksičnosti metanolnih ekstrakata mirte na testirane bakterijske sojeve *E. coli* IC185 i *E. coli* IC202 korišćen je “spot” test. Ovim testom utvrđene su najniže netoksične koncentracije metanolnih ekstrakata mirte, koje su korišćenje u određivanju antimutagene aktivnosti. Takođe je ispitana toksičnost korišćenog rastvarača etanola. Rezultati “spot” testa prikazani su u tabeli 5.36.

Tabela 5.36. Rezultati ispitivanja toksičnosti ekstrakata mirte i etanola na bakterijskim sojevima *E. coli* IC185 i *E. coli* IC202

Bakterijski soj	Tip testa	Primijenjene koncentracije (µg/disku)					Kontrola (etanol) 1.5
		0.25	0.5	0.75	1.0	1.5	
<i>E. coli</i> IC202	Filter papir	0	11	16	27	31	0
	Bunarčići	0	8.5	18	25.5	39	0
<i>E. coli</i> IC185	Filter papir	0	12	16	26.5	37	0
	Bunarčići	0	15	17.5	28	39	0

Napomena: prečnik zone inhibicije izražen je u mm

Iz rezultata prikazanih u tabelama se može vidjeti da su za ekstrakt mirte utvrđene najniže netoksične koncentracije u opsegu od 0.25-0.5 µg/disku, tako da su za dalja antimutagena ispitivanja korišćene koncentracije ekstrakta koje su manje od utvrđenih najnižih netoksičnih koncentracija.

Rezultati određivanja antimutagenog efekta ekstrakata mirte na spontanu i t-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202 dati su u tabeli 5.37. kao i na slici 5.25.

Tabela 5.37. Antimutageni efekat metanolnog ekstrakta *M. communis* L. na spontanu i t-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202

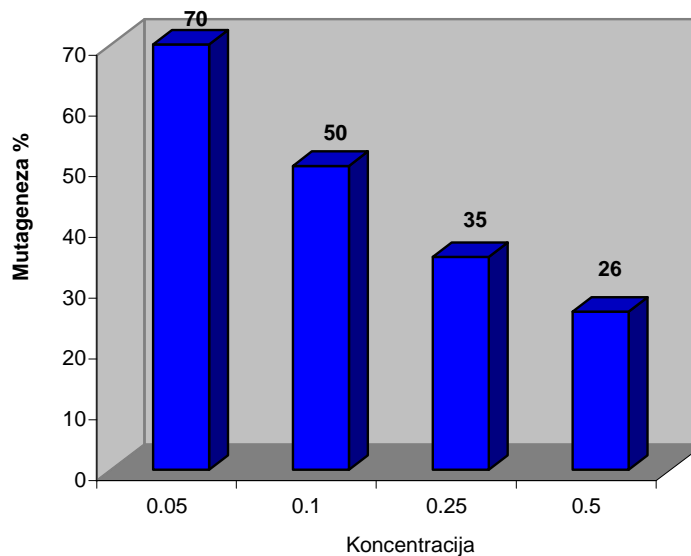
Koncentracija ($\mu\text{g/p}$)	- t-BOOH		+ t-BOOH ¹	
	Trp ⁺ /p ²	Mutageneza ³ (%)	Trp ⁺ /p	Mutageneza (%)
0	107 \pm 6	-	176 \pm 3	-
etanol	99 \pm 5	-	181 \pm 6	-
0.05	97 \pm 9	4	135 \pm 2	70
0.1	85 \pm 7	15	119 \pm 5	50
0.25	76 \pm 11	23	91 \pm 7	35
0.5	60 \pm 4	39	55 \pm 4	26

¹ Koncentracija t-BOOH je 25 $\mu\text{g/p}$

² Trp⁺/p (Trp⁺/ml = Trp⁺/p x 10)

³ Procenat mutageneze (računato u odnosu na etanol kao kontrolu)

* p \leq 0.0

**Slika 5.25.** Antimutageni efekat metanolnog ekstrakta *M. communis* L. na t-BOOH indukovanu mutagenezu u *E. coli* IC202

Iz prikazanih rezultata evidentno je da ispitivani metanolni ekstrakt mirte pokazuje značajno antimutageno djelovanje koje je u korelaciji sa primjenjenom koncentracijom.

Uzimajući u obzir podatke o hemijskom sastavu ovoga ekstrakta, sa velikom sigurnošću može se pretpostaviti da su nosioci antimutagenog djelovanja jedinjenja fenolne strukture, najverovatnije iz klase flavonoida i fenilpropanskih kiselina. Potvrđena je antimutagena aktivnost mircetin-3-*o*-galaktozida i mircetin-3-*o*-ramnozida, komponenti iz ekstrakata mirte. Mehanizam antimutagene aktivnosti ovih jedinjenja uključuje modulaciju ekspresije gena uključenih u regulaciju oksidativnog stresa (GPX1, TXN, AOE372, SEPW1, SHC1, TXNRD1, TXN, SOD1 AOE372, SEPW1), kao i gena koji učestvuju u reparaciji DNK-a (XPC, LIG4, RPA3, PCNA, DDIT3, POLD1, XRCC5, MPG, TDG, PCNA, LIG4, XRCC5, DDIT3, MSH2, ERCC5, RPA3, POLD1) i apoptozi (PARP) (Hyder et al., 2007).

U određivanju antimutagene aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata mirte, *t*-BOOH je korišćen kao mutagen, i na osnovu razlika u koncentracijama koje su primijenjene na sojevima sa efikasnom antioksidativnom zaštitom i *oxyR* soja, jasno je da *t*-BOOH efikasno indukuje oksidativna oštećenja (Mitić-Ćulafić et al., 2009). Efekat korišćenog mutagena se ispoljava preko visoko reaktivnih alkoksil radikala nastalih redukcijom *t*-BOOH u prisustvu tranzicionih metala kao što je Fe²⁺, koji dovode pre svega do oštećenja membrana i do lipidne peroksidacije (Asad et al., 2000, Gille and Sigler, 1995). Alkoksil radikali mogu da oštete DNK izazivajući prekide lanaca ili formiranjem baznih adukata (8-oxoG) (Mahler et al., 2001). Sem alkoksil radikala reduktivnom degradacijom mogu nastati i *tert*-butoksil i metil radikali, a oksidativnom *tert*-butilhidroperoksil radikali (Edenharder and Grunhage, 2003). Povećani mutageni i letalni efekat *t*-BOOH u soju IC202 se javlja usled nesposobnosti ekspresije *ahpC/F* operona koji kodira alkil hidroperoksid reduktazu. Uzimajući u obzir da su bakterijske ćelije tretirane istovremeno sa antioksidantima (ekstrakti) i mutagenom (*t*-BOOH), može se pretpostaviti da je redukcija mutageneze povezana sa skevindžer aktivnošću na ROS ili direktnom interakcijom sa *t*-BOOH. Ispitivani ekstrakt mirte ispoljio je jak antimutageni potencijal i to u okviru netoksičnih koncentracija 0.05-05 µg/p. Ako se ovi rezultati povežu sa antioksidantnim aktivnostima u različiti *in vitro* sistemima, najverovatnije je da je ovako visoka antimutagena aktivnost upravo rezultat snažnih antioksidantnih i skevinder aktivnosti jedinjenja prisutnih u metanolnom ekstraktu uzorka. Ovoj hipotezi ide u prilog i poređenje rezultata antioksidantnog i antimutagenog efekta etarskih ulja i metanolnih ekstrakata. Iako su etarska ulja pokazala i jednu i drugu aktivnost njihov učinak je bio slabiji. Generalno terpeni etarskih ulja su slabiji antioksidansi od fenolnih jedinjenja

zastupljenih u ekstraktima mirte, što se najverovnije i reflektovalo na njihov ukupni antimutageni potencijal.

Ovi rezultati su od izuzetnog značaja jer sugerišu mogućnosti da se na osnovu testova antioksidantnih potencijala pojedinih jedinjenja ili složenih ekstrakata predvidi i njihova eventualna antimutagena aktivnost. Međutim ova istraživanja moraju obuhvatiti veći broj testova da bi se dobili naučno relevantni rezultati i objasnili mehanizmi antimutagenog dejstva.

6. Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih u toku biohemijskih i biloških ispitivanja etarskih ulja i metanolnih ekstrakata vrste *Myrtus communis* L. mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Količine etarskih ulja u osušenim listovima mirte kretale su se od 0.40% (uzorak sa lokaliteta Budva) do 0.81% (uzorak sa lokaliteta H.Novi). Dobijene vrijednosti uglavnom odgovaraju podacima koji se mogu naći u literaturi. Jedino je količina etarskog ulja u uzorku sa lokaliteta Budva (0.40%) daleko ispod granice do sada poznatih vrijednosti.
- Količina oksidovanih monoterpena u etarskim uljima mirte, približno je ista na većini lokaliteta i kreće se u rasponu od 48,92-61,5%, osim na lokalitetu Ulcinj gdje je zabilježena nešto veća vrijednost (78,39%).
- Količina monoterpenskih ugljovodonika u ispitivanim uzorcima etarskih ulja mirte sa većine lokaliteta crnogorskog primorja, približno je ista, i kreće se od 35,5-45,2%, osim na lokalitetu Ulcinj gdje je zabilježena znatno manja vrijednost (17,75%).
- Pored jedinjenja iz klase monoterpena, u ispitivanim uzorcima etarskih ulja mirte, prisutni su i seskviterpenoidi, ali u znatno manjoj količini. Među prisutnim seskviterpenskim jedinjenjima dominiraju seskviterpenski ugljovodonici (1,9-2,5%), dok su oksidovani seskviterpeni zastupljeni u minimalnoj količini (0,00-0,85%).
- Količina alifatičnih jedinjenja u etarskim uljima mirte približno je jednaka na većini ispitivanih lokaliteta (0.37-0.73%), osim na lokalitetu Ulcinj gdje je konstatovana znatno veća vrijednost (1.92%).
- Analizom rezultata hemijskog sastava etarskih ulja mirte sa šest lokaliteta crnogorskog primorja, može se zaključiti da u kvalitativnom sastavu nema značajnijih razlika. Uzorak sa lokaliteta Budva ističe se po znatno nižem

sadržaju mirtenil acetata (2.66%). Sumarno posmatrano u svim uzorcima etarskog ulja mirte dominiraju komponente iz klase oksidovanih monoterpena: 1,8-cineol (18.81-25.68%), linalol (10.05-16.13%), mirtenil acetat (2.66-21.64%), a od monoterpenkih ugljovodonika ističe se α -pinen kao kvantitativno najzastupljenija komponenta (14.67-36.77%).

- Najveće razlike u hemijskom sastavu etarskih ulja mirte nađene su u sadržaju mirtenilacetata i α -pinena. S obzirom na sadržaj ova dva jedinjenja ističe se uzorak sa najjužnijeg lokaliteta crnogorskog primorja, Ulcinja, koji se može svrstati u poseban hemotip sa visokim sadržajem mirtenil acetata (21.64%) i malim sadržajem α -pinena (14.67%).
- Ispitivanjem kvalitativnog i kvantitativnog sastava etarskih ulja mirte može se uočiti da osim evidentne kvantitativne razlike, ne postoji značajnija kvalitativna razlika između ispitivanih uzoraka. Kvantitativnom analizom utvrdili smo da u odnosu na uzorke sa ostalih lokaliteta najviše odstupa uzorak sa lokaliteta Bar gdje je količina 1,8-cineola (10.7%) značajno manja u odnosu na ostale uzorke (17.3-19.3%), dok je količina monoterpenkog alkohola linalola (22.1%) znatno iznad vrijednosti dobijenih za uzorke sa ostalih lokaliteta (8.4-15.9%). Takođe količina oksidovanih monoterpena (92.65%) kod pomenutog uzorka je znatno veća u odnosu na ostale ispitivane uzorke (79.65-85.06%).
- U poređnom analizom hemijskog sastava metanolnih ekstrakata mirte sa različitih lokaliteta može se zaključiti da ne postoje značajne kvalitativne razlike.
- Metanolni ekstrakti mirte odlikuju se visokim sadržajem fenolnih jedinjenja od kojih su dominantne komponente iz klase flavonoida, a naročito flavonol-3-O-monoglikozidi i flavonol-7-O-diglikozidi. U uzorcima metanolnih ekstrakata je takođe identifikovano značajno prisustvo fenolkarbonskih kiselina i njihovih derivata. HPLC-DAD hromatografskom analizom utvrđeno je prisustvo elagne kiseline i njenih derivata, što ukazuje na značajno prisustvo taninskih komponenti u ispitivanim uzorcima mirte.

- Uzorci ispitivanih etarskih ulja mirte sa lokaliteta Ulcinj i H. Novi, pokazali su približno istu sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala. RSC je opadala u nizu: PG (0.42 µg/ml) > BHA (3.09 µg/ml) > uzorak H.Novi (5.99 µg/ml) > uzorak Ulcinj (6.24) > BHT(8.62 µg/ml)
- Za antiradikalnu aktivnost etarskih ulja mirte, najodgovorniji je oksidovani monoterpen 1,8-cineol koji je u etarskom ulju mirte zastupljen u značajnoj količini.
- Ispitivana etarska ulja mirte ispoljila su slab inhibitorni efekat na proces lipidne peroksidacije u lipozomima. Pri primijenjenim koncentracijam IC₅₀ vrijednost nije postignuta.
- Svi ispitivani uzorci metanolnih ekstrakata mirte pokazali su visoku RSC – aktivnost u pogledu neutralizacije ispitivanih radikala (DPPH[•], O₂^{•-}, OH[•] i NO[•]), kao i inhibicije pocesa lipidne peroksidacije i inhibicije enzima ksantin-oksidade.
- Visoka antiradikalna aktivnost u pogledu neutralizacije DPPH[•] radikala ispoljena je kod svih ispitivanih uzoraka metanolnih ekstrakata mirte. RSC je opadala u nizu: PG (IC₅₀= 0.49 µg/ml) > uzorak Bar (IC₅₀= 1.53 µg/ml) > uzorak Ulcinj (IC₅₀= 1.75 µg/ml) > uzorak H. Novi (IC₅₀= 1.78 µg/ml) > uzorak Budva (IC₅₀= 1.80 µg/ml) > BHA (IC₅₀= 2.02 µg/ml) > uzorak Tivat (IC₅₀= 2.03 µg/ml) > uzorak Kotor (IC₅₀= 2.07 µg/ml) > BHT (IC₅₀= 8.28 µg/ml)
- Svi ispitivani uzorci metanolnih ekstrakata mirte ispoljili su inhibitorni efekat na proces lipidne peroksidacije u značajnom procentu. U Fe²⁺/askorbat indukovanoj lipidnoj peroksidaciji jačina ihibicije opadala je u nizu: BHT (IC₅₀= 3.43 µg/ml) > PG (IC₅₀= 17.23 µg/ml) > uzorak H. Novi (IC₅₀= 72.53 µg/ml) > uzorak Bar (IC₅₀= 79.82 µg/ml) < uzorak Kotor (IC₅₀= 90.6 µg/ml) >

uzorak Budva ($IC_{50} = 95.45 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Tivat ($IC_{50} = 96.46 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Ulcinj ($IC_{50} = 100.97 \mu\text{g/ml}$).

- Značajnu antiradikalnu aktivnost u pogledu neutralizacije OH^\bullet radikala ispoljili su svi ispitivani uzorci metanolnih ekstrakata mirte. Skevindžer aktivnost opadala je u sledećem nizu: BHT ($IC_{50} = 28.16 \mu\text{g/ml}$) > BHA ($IC_{50} = 29.87 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Ulcinj ($IC_{50} = 234.71 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Budva ($IC_{50} = 253.56 \mu\text{g/ml}$) > H. Novi ($IC_{50} = 255.54 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Bar ($IC_{50} = 297.42 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Tivat ($IC_{50} = 305.71 \mu\text{g/ml}$).
- Ispitivani uzorci metanolnih ekstrakata mirte ispoljili su nešto slabiju aktivnost u pogledu neutralizacije NO radikala u odnosu na komercijalne sintetske antioksidante. RSC je opadala u nizu: PG ($IC_{50} = 18.21 \mu\text{g/ml}$) > BHA ($IC_{50} = 155.91 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Budva ($IC_{50} = 536.87 \mu\text{g/ml}$) > BHT ($IC_{50} = 724.82 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Ulcinj ($IC_{50} = 794.56 \mu\text{g/ml}$) > uzorak H. Novi ($894.63 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Tivat ($IC_{50} = 924.94 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Kotor ($IC_{50} = 939.66 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Bar ($IC_{50} = 961.92 \mu\text{g/ml}$).
- Značajnu antiradikalnu aktivnost u pogledu neutralizacije O^{2-} radikala ispoljili su svi ispitivani uzorci metanolnih ekstrakata mirte. Skevindžer aktivnost opadala je u sledećem nizu: PG ($IC_{50} = 0.0635 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Ulcinj ($IC_{50} = 0.287 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Budva ($IC_{50} = 0.438 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Tivat ($IC_{50} = 0.527 \mu\text{g/ml}$) > uzorak H.Novi ($IC_{50} = 0.667 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Bar ($IC_{50} = 0.723 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Kotor ($IC_{50} = 0.715 \mu\text{g/ml}$).
- Ispitivani uzorci metanolnih ekstrakata mirte ispoljili značajnu aktivnost u pogledu inhibicije enzima ksantin-oksidade. Sposobnost inhibicije enzima ksantin-oksidade opadala je u sledećem nizu: PG ($IC_{50} = 0.061 \mu\text{g/ml}$) > uzorak H.Novi ($IC_{50} = 0.3081 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Ulcinj ($IC_{50} = 0.3325 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Tivat ($IC_{50} = 0.5055 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Budva ($IC_{50} = 0.5254 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Kotor ($IC_{50} = 0.6068 \mu\text{g/ml}$) > uzorak Bar ($IC_{50} = 0.626 \mu\text{g/ml}$).

- Svi ispitivani uzorci metanolnih ekstrakata mirte ispoljili su visok redukcionog potencijal. Vrijednosti ukupnog redukcionog potencijala opadale su sledećim redom: uzorak Budva (3.00) > uzorak Kotor (2.75) > uzorak H.Novi (2.72) > uzorak Tivat (2.50) > uzorak Ulcinj (2.28) > uzorak Bar (1.92). Napomena: vrijednosti su izražene u ekvivalentima askorbinske kis./ g ekstrakta.
- Ispitivanjem antibakterijska aktivnosti etarskih ulja i metanolnih ekstrakata mirte generalno je utvrđeno snažno djelovanje na većinu testiranih bakterijskih sojeva.
- Antibakterijski efekat etarskih ulja mirte je uočen na sledećim sojevima:
 - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 - *Bacillus subtilis* ATCC 10774
 - *Micrococcus flavus* ATCC 10240
 - *Escherichia coli* ATCC 25922
 - *Klebsiella pneumoniae* NCIB 9111
 - *Escherichia coli* SY 252
 - *Escherichia coli* lpca (IB 112)
- "Disk difuzionim" testom je ispitano dejstvo etarskog ulja mirte na devet bakterijskih sojeva. Pri koncentraciji od 3.32 µl/disk, etarsko ulje je djelovalo inhibitorno (baktericidno ili bakteriostatički) na sve bakterijske sojeve osim na *P.aeriginosa*. Najveća zona inhibicije rasta (33 mm) uočena je kod bakterijskog soja *K.pneumoniae* (pri 3.32 µl/disk).
- Na osnov rezultata MIC testa, minimalna inhibitorna koncentracija konstatovana je za sedam bakterijskih sojeva od ispitivanih osam. MIC nije konstatovan za bakterijski soj *E.coli* SY 252 pri datim koncentracijama, a konstatovan je za sledeće bakterijske sojeve: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bacillus subtilis* ATCC 10774; *Micrococcus flavus* ATCC 10240; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Klebsiella pneumoniae* NCIB 9111; *Escherichia coli* lpca (IB 112).

- Možemo zaključiti da se bakterijski soj *E.coli* SY 252 pokazao veoma rezistentan, kako na djelovanje etarskih ulja tako i metanolnih ekstrakata mirte (nije konstatovan MIC).
- Može se uočiti da između tri odabrana lokaliteta mirte ima određenih razlika u antibakterijskom djelovanju, ali te razlike nisu značajnijeg obima.
- Etarsko ulje mirte ispoljilo je značajan antimutageni potencijal (u okviru netoksičnih koncentracija), koji se vjerovatno zasniva na antioksidantnoj aktivnosti njihovih komponenti.
- Ekstrakti mirte ispoljili su jak antimutageni potencijal. S obzirom na hemijski sastav ekstrakata može se zaključiti da je antimutagena aktivnost vjerovatno vezana za dominantne komponente: flavonoide, tanine i fenolkarbonske kiseline.

7. Literatura

Ahmad, N. and Mukhtar, H. (1999): Green tea polyphenols and cancer: Biologic mechanisms and practical implications. *Nutr. Rev.*, 57: 78-83.

Arora, A., Nair, G.M., Strasburg, M.G. (1998): Structure activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Rad. Biol. Med.*, 24: 1355-1363.

Arvouet-Grand, A., B. Vennat, A. Pourrat, P. Legret,(1994): Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. Pharm. Belg.*, 49: 462-468.

Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., Storz, G. (1999): Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 96: 6161-6165.

Ayoola, G.A., Lawore, F.M., Adelowotan, T., Aibinu, I.E., Adenipekun, E., Coker, H.A.B., Odugbem, T.O. (2008): Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzigium aromaticum* (clove). *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2: 162-166.

Babu, B. H., Shylesh, B. S., Padikkala, J. (2001): Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia*, 72: 272-277.

Baytop, T. (1999): Therapy with medicinal plants in Turkey – Past and Present, 2nd ed., Nobel Publishers, Istanbul.

Behl, C., Davis, J.B., Lesle, R., Schubert, D. (1994): Hydrogen peroxide mediates amyloid b-protein toxicity. *Cell*, 77: 817-827.

Berger-Jerkić, O., Jovanović, K.M., Kocić, B., Kulauzov, M., Nedeljković, R.M., Otašević, M., Pečić, J., Švabić-Vlahović, J.M. (1997): Specijalna bakteriologija. Savremena administracija, Beograd.

Berić-Bjedov, T., Nikolić, B., Stanojević, J., Qinming, X., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Simić, D., Knežević-Vukčević, J. (2006): Antimutagenic effect of basil (*Ocimum basilicum* L.)

Berić, T., Nikolić, B., Stanojević, J., Vuković-Gačić, B., Simić, D., Knežević-Vukčević, J. (2008): Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food Chem. tehnol.*, 46: 724-732.

Berliner, J.A. and Haberland, M.E. (1993): The role of oxidized low-density lipoproteins in atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 4: 373-381.

Bezerra, D., José, D. B., Marinho, F., Ana Paula, N. N., Alves, C.P., Manoel, O., Otília, P., L. Pessoa, Maria Conceição, M. Torres, Edilberto, R. Silveira, Francisco, A. Viana, Letícia, V. Costa-Lotufu (2009): Antitumor Activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. *Chem. Biodivers.*, 6(8): 1224 – 1231.

- Bharate, S.B., Khan, S.I., Yunus, N.A., Chauthi, S.K., Jacob, M.R., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Singh, I.P. (2007): Antiprotozoal and antimicrobial activities of O-alkylated and formylated acylphloroglucinols. *Bioorg. Med. Chem.*, 15(1): 87-96
- Bjelland, S. and Seeberg, E. (2003): Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mut. Res.*, 531: 37-80.
- Blanco, M., A. Urios, A., Martinez (1998): New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens, *Mutant. Res.* 413,: 95-101.
- Blumenthal, R. (1999): The complete German commission E monographs. American Botanical Council, Austin.
- Bohm, H., Boeing, H., Hempe, J., Raab, B., Kroke, A. (1998): Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft.* 37: 147-163
- Boelens, M.H. and Jimenez, R., (1991): The chemical composition of Spanish myrtle leaf oils. *J. Essent. Oil Res.* 3 (3), 173-177.
- Bonjar, G.H., (2004): Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. *in PubMed will retrieve 4 records.*
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990): Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods in Enzymol.*, 186: 343-355.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Hamdi, M., Chaabouni, M.M. (2003): Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour and fragrance journal*, 18: 380-383.
- Božin, B. (2004): Antimikrobna i antioksidativna aktivnost etarskih ulja fam. *Lamiaceae*. Magistarski rad. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Božin, B., Mimica-Dukić, N., Simin, N., Anačkov, G. (2006): Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric.Food Chem.*, 54, 1822-1828.
- Božin, B., Mimica-Dukić, N., Smojlik, I., Jovin, E. (2007): Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *J. Agric.Food Chem.*, 55, 7879-7885.
- Božin, B. (2009): Biohemijska i farmakološka ispitivanja vrsta roda *Allium* L. (Sect. *Allium*). Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Bray, T.M. (1999): Antioxidants, NFB activation, and diabetogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 222: 205-213.

Brewster, L.J. and Rabinowich, D.H. (1990): Onions and allied crops, Volume III Biochemistry, Food Science and Minor Crops. CRC Press, Boca Raton Florida.

Brude, R.I., Drevon, A.C., Hjermmann, I., Seljeflot, I., Lund-Katz, S., Saarem, K., Sandstad, B., Salvoll, K., Halvorsen, B., Arnesen, H., Neusetter, S.M. (1997): Peroxidation of LDL From Combined-Hyperlipidemic Male Smokers Supplied with ω -3 Fatty Acids and Antioxidants. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17: 2576-2588.

Bruneton, J. (1999): Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, 2nd edition. Intercept Ltd., London, Paris, New York.

Buchbauer, G. and Jirovetz, L. (1994): Aromatherapy-use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flav. Fragr. J.*, 9: 217-222.

Cadenas, E. and Davies, J.A.K. (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad.Biol. Med.*, 29: 222-230.

Chatterjee, S. N. and Agarwal, S. (1988): *Free Radical Biol. Med.*, 4, 51. Coakley, W. T. and Nyborg, W. L. (1978) in *Ultrasound: Its applications in medicine and biology* (ed. F. J.Fry)(Amsterdam: Elsevier).

Chamount, J.P. and Leger, D. (1992): Campaign against allergic moulds in dwellings. Inhibitor properties of essential oil geranium "Bourbon", citronellol, geraniol and citral. *Ann. Pharm. Fr.*, 50 (3): 156-166.

Chun-Mao, L., Chien-Shu, C., Chien-Tsu, C., Yu-Chih L., Jen-Kun L. (2002): Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 294: 167-172.

Ciuffi, M., Gentillini, G., Franchi-Micheli, S., Zilletti, L. (1991): Lipid peroxidation induced "in vivo" by iron carbohydrate complex in the rat brain cortex. *Neurochem. Res.*, 16: 43.

Cook, N.C. and Samman, S. (1996): Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.*, 7: 66- 76.

Connolly, J.D. and Hill, R.A., (1991): Dictionary of Terpenoids, Volume 1 Mono- and sesquiterpenoids. Chapman & Hall, USA.

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, P.J., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Van den Berghe, D. (1998): Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxid scavengers. *J. Nat. Prod.*, 61(1): 71-76.

Crowell, P.L., Ayoubi, S., Burke, Y.D. (1996): Antitumorigenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 401: 131-136.

Das, T. N., Huie, R. E., Neta, P. (1999): Reduction potentials of SO^{-3} , SO^{-5} , and $\text{S}_4\text{O}_3^{-6}$ radicals inaqueous solutions. *J.Phys. Chem. A* 103, 3581-3588

- Davydov, V., Hansen, L.A., Shackelford, D. (2003): Is dna repair compromised in alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* 24: 953–968.
- De Flora, S., Izzotti, A., D Agostini, F., Balansky, M.R., Noonan, D., Albini, A. (2001): Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mut. Res.*, 480-481, 9-22.
- De Flora, S. and Ferguson, R.L. (2005): Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mut. Res.*, Article in press.
- Della Loggia, R. (1998): New trends in phytotherapy: Some practical examples. V Meeting Days of Medicinal Plants, Banja Koviljaca, pp. 74-75.
- De Laurentis, N., Rosato, A., Gallo, L., Leone, L., Milillo, M.A. (2005): Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrtus communis*. *Riv. Ital.*, 39: 3-8
- Devon, T.K. and Scott, A.I. (1972): Handbook of naturally occurring compounds. Vol. II, Terpenes: 3-184, Academic Press, New York.
- Dewick, P.M. (2002): Medicinal natural products. A biosynthetic approach: 2nd ed., John Wiley and Sons, Chichester, UK, 507 pp., bibliography, index, numerous chemical line drawings.
- Dikalov, S., Skatchkov, M., Bassenge, E. (1997): Quantification of Peroxynitrite, Superoxide, and Peroxyl Radicals by a New Spin Trap Hydroxylamine 1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 230: 54-57.
- Dixon, R.A. and C.L. Steele. (1999). Flavonoids and isoflavonoids-a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4: 394-400.
- Draper, H.H., Saari Csallany, A., Hadley, M. (2000): Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation *in vivo*. *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 1071-1077.
- Djordjevic, S., Noone, K., Smith, L., Hornitzky, M.(1998): Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*, *J. Apic. Res.*, 37, 165–174.
- Dulger, B. and Gonuz, A. (2004): Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian J. Plant Sci.*, 3(1): 104-107.
- Edwards, R. and Gatehouse, J. A. (1999): Secondary metabolism. *In*: Lea P. J., Leegood R. C. (Eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Chichester, UK: 193-218.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A. (2001): Deoxyxylose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Sci.*, 6: 354-355.

- Emsley, J. (2001): "Oxygen". *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*. Oxford, England, UK: Oxford University Press. pp. 297–304.
- Ercisli, S., Mustafa, A., Ozlem, O., Memnune, S., Emine, O. (2008): Phenolic and antioxidant diversity among persimmon (*Diospyrus kaki* L.) genotypes in *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 59(6): 477 – 482.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. (2000): Characterisation of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; *J. Agric. Food Chem.*, 48: 648-656.
- Euzéby, J.P. (2008): "Bacillus". *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. <http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html>.
- European Pharmacopoeia, 4th ed., Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2002.
- Ganong, W.F. (1993): Pregled medicinske fiziologije, Savremena administracija, Beograd.
- Garry, R.P. and Chalchat, J.C., (1992): Les huiles essentielles de Myrte du pourtour méditerranéen, 10emes Journées Internationales des Huiles essentielles, Digne-les-Bains, 5-7/9/1991, Actes, Rivista ital. EPPOS, N° special, 524-532.
- Gauthier, R., Gourai, M., Bellakhdar, J. (1988): A propos de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. Var. *Italica* récolte au Maroc. I. Rendements et compositions durant un cycle végétatif annuel. *Al Biruniya. Rev. Mar. Pharm.*, 4: 97-116.
- Gokce, G. i Mehmet Zeki Haznedaroglu, (2008): Evaluation of antidiabetic, antioxidant and vasoprotective effects of *Posidonia oceanica* extract. *Journal of Ethnopharmacology* Volume 115, Issue 1,4 pp.122-130.
- Grlić, Lj., (1986): Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb.
- Grubor-Lajšić, G., Andrić, S., Andrić, N., Dragišić, S., Taški, K., Stanić, B., Kostić, T., Kovačević, R. (2000): Changes of antioxidant in aquatic biota- an answer to oil refinery spills. *Cenr. Eur. J. Occup. Environment. Med.*, 6 (2-3): 189-193.
- Groves, T.J. (1999): Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opinon Chem. Biol.*, 3: 226-235.
- Gülten, T., Şahika, A., Mehmet, K. (2008): Efficacy of myrtle oil against *Salmonella typhimurium* on fresh produce. *Int. J. Microbiol.*, 130(2): 147-150.
- Hadacek, F. and Greger, H. (2000): Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choise. *Phytochem. Anal.*, 11: 137-147.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999): Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell B. i Whiteman M. (2004): Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.*, 142:231–255

Haraguchi, H., Saito, T., Ohamura, N., Yagi, A. (1995): Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med.*, 61: 333-336.

Harborne, J. B. (1989): Plant Phenolics. In Dey P. M., Harborne J. B. (series ed.): Methods in Plant Biochemistry, Volume 1. Academic Press, Hartcourt Brace Jovanovich Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 3.

Harvey, A. (2000): Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Disc. Today*, 5: 294-300.

Hayder, N., Abdelwahed, A., Kiliani, S., Ben Ammar, R., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. (2004): Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis* L. *Mut. Res.*, 564: 89-95.

Hayder, N., I., Bouhlel, I., Skandrani, M., Kadri, R., Steiman, P., Guiraud, A., Mariotte, K., Ghedira, M., Dijoux-Franca and L., Chekir-Ghedira (2007): In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-*o*-galactoside and myricetin-3-*o*-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicol. In Vitro.*, 22(3).

Hegenauer, R. (1982): Distribution and chemotaxonomy of essential oils. In: Atal, C.K., Kapur, B.M. (ur.): Cultivation and utilization of aromatic plants: 1-2, Regional research laboratory Jammu-Tawi (India).

Hefendekel, F.W. and Murray, M.J. (1978): Genetic aspects of the biosynthesis of natural odors. *Liqydia* 39: 39-52.

Hills, J.M. and Aaronson, P.I. (1991): The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. An analysis using patch clamp electrophysiology and isolated tissue pharmacology in rabbit and guinea pig. *Gastroent.*, 101(1): 55-65.

Hindler, J.A. and E.J. Baron. (1995): Antimicrobial susceptibility testing of aerobic and facultative bacteria. ASCP Check Sample MB 95-8; 38: 117-142. *Amer. Soc. for Clin. Pathol.* Chicago, IL

Hinou, J., Demetzos, C., Harvala, C., (1989): Polyphenolic compounds of *Myrtus communis*. *Fitoterapia*, 60(1): 94.

Hinou, J., Lakkas, N., Philianos, S., (1988): The polyphenolic compounds of *Myrtus communis* L. *Plantas Med. Phytother.*, 22(2): 98-103

Hippeli, S. and Elstner, F.E. (1999): Transition metal ion catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. *FEBS Letters*, 443: 1-7.

Hodnick, W. F., Kung, F. S., Roettger, W. J., i Bohmont, C. W. (1986): Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 35:2345-2357.

Hoult, J.R.S. and Paya, M. (1996): Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.*, 27: 713-722.

Ferguson, L., Philpott, M., Karuasighe, N. (2004): Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198: 147-159.

Frazao, S., Domingues, A., Sousa, M.B., (1974): Characteristics and composition of the essential oil of *Myrtus communis* L. Paper N^o. 112, 6th International Congress of Essential Oils, San Francisco.

Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E. (2002): Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65, 1545-1560

Igarashi, K. and Ohmuma, M. (1995): Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59: 595-601.

Inouye, S, Takizawa, T, Yamaguchi, H. (2001): Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrobial Chemother.*, 47: 565-573.

Imlay, J.A., and Linn, S. (1988): DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240(4857): 1302-1309.

Janković, M. (1979): Fitoekologija s osnovama fitocenologije i pregledom tipova vegetacije na zemlji, Naučna knjiga, Beograd.

Jančić, R., Stošić, D., Mimica-Dukić, N. (1995): *Angiospermae*. U: Jančić, R., Stošić, D., Mimica-Dukić, N., Lakušić, B.: Aromatične biljke Srbije: 156-285, NIP DEČIJE NOVINE, Beograd-Gornji Milanovac.

Joseph, M.I., Pichon, P.N., Raynaud, J. (1987): Flavonoic heterosides of *Myrtus communis* (Myrtaceae). *Pharmazie*, 42(2): 142.

Jovanović, B. (1991): Dendrologija, Naučna knjiga, Beograd.

Jimenez, M. and Garcia-Carmona, F. (1999): Myrcetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1993-2000.

Karakašević, B. (1977): Patogenost i virulencija mikroorganizama (Infekcija i otpornost). U: Karakašević, B. (ur.): Mikrobiologija i parazitologija: 255-373, Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb.

Karakašević, B. (1977a): Delovanje hemioterapeutika i antibiotika na mikroorganizme (Morfolologija i fiziologija bakterija). U: Karakašević, B. (ur.): Mikrobiologija i parazitologija: 161-195, Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb.

Karlsom, J., Borg, A.K., Unelius, R., Shoshan, M.C., Wilking, N., Ringborg, U., Linder, S. (1996): Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes in vitro: evidence of a Ras-independent mechanism of action. *Anti-cancer Drug.*, 7(4): 422-429.

Kim, H. and Kim, H. K. (1998): Effect of nitric oxide on hydrogen peroxide – induced damage in isolated rabbit gastric glands. *Pharmacology*, 57: 323-330.

Kim, J. H., Woo, E., Shin, C., Park, H. (1998): A new flavonol glycoside gallate ester from *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. *J. Nat. Prod.*, 61: 145-148.

Koch-Heitzmann, I. and Schultze, W. (1984): Eine alte Arzneipflanze mit neuen therapeutischen Wirkungen. *Deutsche Apothek. Zeitung*, 124: 2137-2145.

Kovačević, N. (2004): Osnovi farmakognoziije, Srpska školska knjiga, Beograd.

Kojić, M., Stamenković, V., Jovanović, D. (1998): Lekovite biljke jugoistočne Srbije, ZUNS, Beograd.

Kohlert, C., van Rensen, I., Marz, R., Schindler, G., Graefe, E.U., Veit, M. (2000): Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans, *Planta medica* 66: 495-505.

Kromhout, D. (1999): Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids*, 34: S27-S31.

Kujundžić, S. (2002): Biohemijska ispitivanja biljnih vrsta porodice *Apiaceae*. Magistarski rad. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.

Kuroda, J. (1990): Antimutagenesis studies in Japan. *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II*. Plenum Press N.Y. 52, 1-22.

Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C., Carnat, A. (1991): Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharm. Acta Helv.*, 66: 185-188.

Lange, B.M. and Croteau, R. (1999): Genetic engineering of essential oil production in mint. *Curr. Opin. in Plant Biol.*, 2: 139-144.

Laposata, M., Van Cott, E.M., Lev, M.H. (2007): 40-Year-Old Woman with Epistaxis, Hematemesis, and Altered Mental Status. *Parametr "periodikum" je povinný!*, 356(2): 174–82.

Lawrence, B.M. (1997): Progress in essential oils: *Ocimum gratissimum* oil. *Perfum. Flavor.*, 22: 70-74.

Letchamo, W. and Gosselin, A. (1995): Effects of supplementallighting and soil water levels on growth, essential oilcontend and composition of two thyme (*Thymus vulgaris L*) clonal selections. *Canadian J. Plant Sci.*, Ottawa, 75(1): 231-238.

Leucuta, S., L. Vlase, S. Gocan, L. Radu, C. Fodorea, (2005): Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC. *J. of Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 28: 3109–3117.

Lewis, D.J., Sesterhenn, I.A., McCarthy, W.F., Moul, W. (1994): Immunohistochemical expression of p53 tumour supressor gene in adult germ cell testis tumours: clical correlation in stage I disease. *J. Urology*. 152: 418-423.

Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J., Duriez, P., Teissier, E., Cotelle, N. (2000): Antioxidant properties of di-*tert*-butylhydroxylated flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 900-912.

Lukić, P. (1993): Farmakognozija; Farmaceutski fakultet, Beograd.

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970): The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Madigan, M. and Martinko, J. (editors) (2005): Brock Biology of Microorganisms (11th ed.). Prentice Hall.

Mahon, C.R. and G. Manuselis Jr., (1995): *Enterobacteriaceae*. In: Mahon, C.R. and Manuselis, Jr. (Eds.), Textbook of Diagnostic Microbiology. W.B. Saunder Company, London, pp: 450-455.

Marinova, E. M. and Yanishlieva, N.V. (1992): Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation. *J. Sci. Food Agric.*, 60: 313-318.

Marković, B.S. (1990): Mikrobiologija II-bakterije, kvasci i plesni. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.

Marković, S. (2005): Fitoaromoterapija, monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka temelji fitoaromaterapije. Centar Cedrus, Zagreb.

Marnett, L.J. (2000): Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3): 361-370.

Martinet, W., Knaapen, M.W., De Meyer, G.R., Herman, A.G., Kockx, M.M. (2002): Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation.*, 106: 927–32.

Mbwambo, H.Z., Luyengi, L., Kinghorn, A. D. (1996): Phytochemicals: A glimpse into their structural and biological variation. *Int. J. Pharmacogn.*, 34: 335-343.

McCall, R.M., and Frei, B. (1999): Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 1034-1053.

McCaskill, D. and Croteau, R. (1998): Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends in Biotechnol.*, 16: 349-255.

McDonald, S, Prenzler, P.D., Autolovich, M., Robards, K. (2001): Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73: 73-84.

Messina, M. and Barnes, S. (1991): The role of soy products in reducing risk of cancer. *J. Natl. Cancer Inst*; 83(8): 541-546.

Miean, K.H., Mohamed, S. (2001): Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 3106-3112.

Milhau, G., Valentin, A., Benoit, F., Mallié, M., Bastide, J., Péliissier, Y. i Bessiére, J. (1997): *In vitro* antimalarial activity of eight essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 9: 329–333

Mimica-Dukić, N. (1992): Ispitivanje sekundarnih biomolekula u nekim vrstama roda *Mentha*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.

Mimica-Dukić, N., Budimčević, M.M., Mihajlović, A.B., Gašić, S.O. (1994): Antioxidant activity of plant phenolics. Flavonoids and phenolic acids. *J. Serb. Chem. Soc.*, 59: 823-828.

Mimica-Dukić, N. (1995): Metabolizam etarskih ulja. U: Jančić, R., Stošić, D., Mimica-Dukić, N., Lakušić, B.: Aromatične biljke Srbije: 65-92, NIP DEČIJE NOVINE, Beograd-Gornji Milanovac.

Mimica-Dukić, N. (1997): In vivo i in vitro ispitivanja antioksidantnih svojstava biljnih ekstrakata. *Arh. Farm.*, 5: 475-493.

Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., Matavulj, M. (2003): Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oil. *Planta Med.*, 69: 413-419.

Mimica-Dukic, N., Božin, B., Sokovic, M., Simin, N. (2004): Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) essential oil. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 2485-2489.

Mimica-Dukic, N. i Božin, B. (2008): *Mentha* L. species (*Lamiaceae*) as promising sources of bioactive secondary metabolites. *Curr. Pharm. Desing*, 14, 3141-3150.

Mitić-Ćulafić, D., Vukovic-Gacic, B., Knezevic-Vukcevic, J., Stanković, S., Simić, D. (2005): Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 57 (3): 173-178.

- Mitić-Ćulafić, D., B. Zegura, B. Nikolic, B. Vukovic-Gacic, J. Knezevic-Vukcevic, M. Filipic (2009): Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 260–266.
- Mišan, A. (2009): Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Moore, K., Roberts, L.J. (1998): Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res.*, 28: 659-671.
- Mordente, A., Martorana, G. E., Minotti, G., Giardina, B. (1998): Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (idebenone). *Chem. Res. Toxicol.*, 11: 54-63.
- Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P., Cillard, J. (1993): Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.*, 45, 13-19.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (2005): Microbiology. Medical 5th Edition, Mosby.
- Naim, M. Gestetner, B. Zilkah, S. Birk, Y., Bondi, A. (1974): Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. *J. Agr. F. Chem.*, 22, 806-810.
- Namiki, M. (1990): Antioxidants/antimutagens in food. *Food. Sci. Nutr.*, 29: 273-300.
- Napoli M., (1997): What do Women want to know. *J. Nat. Cancer Institute*, Monograph 22: 11– 13.
- Nikolić, B. (2004): Konstrukcija bakterijskih testova za detekciju antimutagenog potencijala antioksidanata. Magistarska teza, Biološki fakultet, Beograd.
- Niwa, Y, and Iizawa, O. (1994): Abnormalities in serum lipids and leukocyte superoxide dismutase and associated cataract formation in patients with atopic dermatitis. *Arch. Dermatol.* 130:1387-1392
- Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., Gilbert, I. (1998): Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Rad. Biol. Med.*, 25: 1057-1065.
- Olinski, R., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., Roszkowski, K., Jaruga, P. (2002): Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic. Biol. Med.*, 33 (2), 192-200.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria *E. coli*O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 18: 414-420.

Owlia, P., Saderi H., Rasooli I. Sefidkon F. (2009): Antimicrobial characteristics of some herbal Oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iran J. Pharm. Res.*, 8 (2): 107-114.

Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F. (1999): Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Rad. Biol. Med.*, 27: 704-724.

Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I. (1993): Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean *Lamiaceae*. *J. Ethnopharmacol.*, 39(3): 167-170.

Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R. (1997): Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89(358): 39-46.

Pekkarinen S. S., Heinonen I. M., Hopia I. A. (1999): Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioidants in methyl linoleate. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 499-506.

Petri, G., Krawczyk, U., Kery, A. (1997): Spectrophotometric and chromatographic investigation of bilberry anthocyanins for quantification purposes. *Microchem. J.*, 55: 12-23.

Pharmacopoea Jugoslavica V, Vol. 2, Droge: 1151-1261. Kovač, M. (ur.), Savremena administracija, Beograd, 2000.

Pichersky E. and Gang R. D. (2000): Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.*, 5, 439-445.

Pichon, P.N., Joseph, M.J., Raynaud, J.,(1993): Myricetin 3-beta-D-(6"-O-galloyl-galactoside) from *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Plantes Med. Phytother.*, 26(2): 86-90.

Popović, M. (2001): Biohemija biljaka, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Powers, K.S., Hamilton, K. (1999): Antioxidants and Exercise. *Clinics in Sports Med.*, 18: 525-536.

Predolac, V. (2000): Ispitivanje rezistencije izolovanih sojeva *E. coli* sa jedne farme svinja prema antimikrobnim sredstvima. Specijalistički rad, Fakultet Veterinarske Medicine, Univerzitet u Beogradu.

Primiano, T., Sutter, R.T., Kensler, W.T. (1997): Redox regulation of genes that protect against carcinogens. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118B: 487-497.

Pryor, W.A. (1976): The role of free radical reactions in biological systems. In: Pryor, W.A.: Free radicals in biology, Vol. I: 1-50, Academic Press Inc., New York.

- Rasooli, I., Moosavi, M.L., Rezaee, M.B., Jaimand, K. (2002): Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. *J. Agric. Sci. Technol.*, 4(3/4): 127-133.
- Ríos, J.L., Recio, M.C., Villar, A. (1991): Isolation and identification of the antibacterial compounds from *Helichrysum stoechas*. *J. Ethnopharmacol.*, 33(1-2): 51-5.
- Reddy, M.V.B., Angers, P., Gosselin, A., Arul, J. (1998): Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits, *Phytochem.*, 47(8): 1515-1520.
- Rolhion, N., Darfeuille-Michaud, A. (2007). "Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease". *Inflamm. Bowel Dis.*
- Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieri, F., Franconi, F.(2004): Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. - *Free Radic. Res.*, 38(1): 97-103
- Runjajić-Antić, D., Kilibarda, V., Dobrić, S. (1998): Pharmacological action of sage (*Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) and its therapeutic use. V Meeting Days of Medicinal Plants, Banja Koviljaca, pp. 42.
- Rusenova, N. and Parvanov, P. (2009): Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary important. *Trakia J. Sci.*, 7(1): 37-43.
- Ruzicka, L., Eschenmayer, A., Heuser, H. (1953): The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9: 357-396.
- Sacchetti, G., Muzzoli, M., Statti, G.A., Conforti, F., Bianchi, A., Agrimonti, C., Ballero, M., Poli, F. (2007): *Nat. Prod. Res.*, 21(2): 167-179.
- Sadraei, H. (2009): Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of Boiss. on ileum contractions. *Phytomedicine*, 8(5): 370-376.
- Sadrzadeh, S.M.H., Eaton, J.W. (1988): Hemoglobin-mediated oxidant damage to the central nervous system requires endogenous ascorbate. *J. Clin. Invest.*, 82: 1510.
- Sarić, M.R. (ur.) (1989): Lekovite biljke SR Srbije. SANU; Beograd.
- Sayre, M.L., Perry, G., Smith, A.M. (1999): Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr. Opin. chem. Biol.*, 3: 220-225.
- Schaller, M., Korting, H.C. (1995): Allergic airborne contact dermatitis from essential oils used in aromatherapy. *Clin. Exp. Dermatol.*, 20: 143-145.
- Shaheen, F., Ahmad, M., Khan, S.N., Hussain, S.S., Anjum, S., Tashkhodjaev, B., Turgunov, K., Sultan, M.N.K., Choudhary, M.I., Rahman, A. (2006): Nel *alfa*-glucosidase inhibitors and antibacterial compounds from *Myrtus communis* L. - *Europ. J. Org. Chem.*, 2371-2377.

Shinar, E., Rachmilewitz, E.A., Shifter, A., Rahamim, E. i Saltman, P. (1989): Oxidative damage to human red cells induced by copper and iron complexes in the presence of ascorbate. *Biochim.Biophys. Acta.*, 1014: 66-72.

Shukla, B., P.K.S., Visen, G.K., Patnaik, S.C., Tripathi, R.C., Srimal, R., Dayal, P.C., Dobhal. (1992): Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from eucalyptus hybrid. *Phytother. Res.*, 6 (2): 74-79.

Simić, M.G. (1988): Mechanisms of inhibition of free radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 202:377-386.

Simic, D., Vukovic-Gacic, B., Knezevic-Vukcevic, J., (1998): Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutat. Res.* 402, 51–57

Simić N, Andjelković S, Palić R, Vajs V, Milosavljević S (2000): Volatile constituents of *Achillea serbica* Nym. *Flavour Fragrance J.* 15:141-143.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.

Sluphaug, G., Kavli, B., Krokan, H.E. (2003): The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mut. Res.*, 531: 231-251.

Soon-Ok Oh, Jung A Kim, Hae-Sook Jeon, Jong Cheol Park, Young Jin Koh, Hyun Hur and Jae-Seoun Hur (2008): Antifungal activity of *Eucalyptus*-derived phenolics against postharvest pathogens of kiwifruits. *Plant Pathol. J.* 24(3): 322-327.

Sota, H., Masahiro, Y., Makoto, F., Fumiyasu, F. (2006): OxyR regulated the expression of two major catalases, KatA and KatB, along with peroxiredoxin, AhpC in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.*, 8 (12): 2115-2124.

Spedding, G., Ratty, A., Middleton, E.J. (1989): Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.*, 12(2): 99-110.

Stanić, G. i Samardžija, I. (2006): Diuretic activity of *Satureja montana subsp. montana* extracts and oil in rats. *Croatia Phytoter. res.*, 7(5): 363 – 366.

Steinmetz, K.A. and Potter, J.D. (1991): Vegetables, fruit and cancer. 1. Epidemiology. *Cancer Cause Control*, 2, 325-357

Stocker, R. (1999): The ambivalence of vitamin E in atherosclerosis. *Trends in Biochem. Sci.*, 24: 219-223.

Strong, R., Wood, W.G., Samorajski, T. (1991): Neurochemistry of aging. U: Pathy, M.S.J. (ur.): Principles and Practice of Geriatric Medicine, 2nd ed.; 69, Wiley & Sons, New York.

Sun, Y. (1990): Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, 8: 583-599.

Swain, T. (1978): Plant-animal co-evolution: A synoptic view of the Palaeozoic and Mesozoic. In *Biochemical aspects of plant and animal co-evolution*, ed. Harborne, J. B. London: Academic Press.

Takasaki, M., Konoshima, T., Kozuka, M., Tokuda, H. (1995): Anti-tumor-promoting activities of euglobals from *Eucalyptus* plants. *Biol. Pharm. Bull.*, 18 (3): 435-438.

Tandon, S.K., S. Chandra, S. Gupta, i Jawahar Lal. (1995): Pharmacological effects of alcoholic extract of *Eucalyptus citriodora* leaves. *Indian Vet. J.*, 72 (7): 762-764.

Tateo, F. and Picci, V., (1982): Prime indagini sulla caratterizzazione GLC-MS dell'olio essenziale di mirto di Sardegna (*Myrtus communis* L.). La Rivista della Societa di Scienza dell' Alimentario, 153-158.

Teuscher, E. (1997): Biogene Arzneimittel, 5th ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Tibballs, J. (1995): Clinical effects and management of eucalyptus oil ingestion in infants and young children. *Med. J. Australia*, 163 (4): 177-180.

Todar, K., (2007): "Pathogenic *E. coli*". Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>.

Torii, S., Fukuda, H., Kanemoto, H., Miyanchio, R., Hamazu, Y., Kawasaki, M. (1988): Contingent negative variation and the psychological effects of odor. U: Toller, S. and Dodd, G.H. (ur.): *Perfumery: The Psychology and Biology of Fragrance*. Chapman and Hall, New York.

Twaij, H.A.A., Sayed-Ali, H.M., Al Zohry, A.M. (1988): Pharmacological phytochemical and antimicrobial studies on *Myrtus communis* part I. Cardiovascular and phytochemical studies. *J. Biol. Sci. Res.*, 19(1): 29-40.

Twaij, H.A.A., Sayed-Ali, H.M., Al Zohry, A.M. (1988): Pharmacological phytochemical and antimicrobial studies on *Myrtus communis* part I. Glycemic and antimicrobial studies. *J. Biol. Sci. Res.*, 19(1): 41-52

Tyler, E.V. (1994): *Herbs of Choice-The Therapeutic Use of Phytochemicals*. Pharmaceutical Product Press, New York, London, Norwood (Australia).

Ultee, A., L.M.G., Gorris, E.J., Smid. (1998): Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 211–218.

Urios, A., Herrera, G., Blanco, M. (1995): Detection of oxidative mutagens in strains of *Escherichia coli* in the OxyR or MutY functions: dependence on SOS mutagenesis. *Mut. Res.*, 332: 9-15.

Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., Bronzetti, G., Simić, D. (2001): Detection of bioantimutagens in *S. Cervisiae* D7. *Arch. Biol. Sci.*, 53: 3-4.

Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E. M. (1984): Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

Wong, W. J., Hashimoto, K., Shibamoto, T. (1995): Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2707-2712.

Van den Berghe, D.A. and Vlietinck, A.J. (1991): Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Hostettman, K. (ur.): Methods in Plant Biochemistry, 6, Assays for Bioactivity: 47-69, Academic Press, London.

Van den Vijver, L.P.L., Kardinaal, A.F.M., Grobbee, D.E., Princen, H.M.G., Van Poppel, G. (1997): Lipoprotein oxidation, antioxidants and cardiovascular risk: epidemiologic evidence. *Prostaglan. Leukotr. Ess. Fatty Acids*, 57(4-5): 479-487.

Vrijssel, R., Everaert, L., VanHoof, L.M., Vlietinck, A.J., VanDenBerghe, D.A., Boeye, A., (1987): The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antiviral Res.*, 7(1): 35-42.

Weisshaar, B. and Jenkins, I. G. (1998): Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1: 251-257.

Yagi, K. (1982): Lipid peroxides in biology and medicine. Academic Press Inc., New York.

Yang, C.S., Chung, J.Y., Yang, G., Chhabra, S.K., Lee, M.J. (2000): Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J. Nutr.*, 130: 472S-478S.

Yen, G.C. and Hsieh, C.L. (1998): Antioxidant activity of extracts from du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3952-3957.

Youdim, K.A. and Deans, S.G. (1999): Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mech. Aging and Dev.*, 109: 163-175.

Yu, S.G., Anderson, P.J., Elson, C.E. (1995): The efficacy of β -ionone in the chemoprevention of rat mammary carcinogenesis. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2144-2147.

Zgorka, G., Glowniak, K. (1999): Simultaneous determination of phenolic acids and linear furanocoumarins in fruits of *Libanotis dolichostyla* by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Phytochem. Analysis*, 10: 268-271.

Šilić, Č., (1990): Ukrasno drveće i grmlje, I izdanje, Svjetlost, Sarajevo.

Žikić, R., Pajović, S., Štajn, A., Pejić, S., Ognjanović, B., Pavlović, S. (1999): Utvrđivanje antioksidativnih komponenata-novi faktor kvaliteta hrane. *Hrana i ishrana*, 40: 51-56.

Wall, M.E., Wani, M.C., Hughes, T.J., Taylor, H. (1988): Plant antimutagenic agents, 1. General bioassays and isolation procedures. *J. Nat. Prod.*, 51: 866-873.

Weyerstahl, P., Marchall, H., Rustaiyan, A., (1994): Constituents of the essential oil of *Myrtus communis* L. from Iran. *Flav. Fragr. J.*, 6: 333-337.

WWW.liberherbarum.com/Minor/UK/Pn0807.htm

WWW. wikipedia.org

8. Prilog

8.1. Antioksidantna aktivnost etraskog ulja mirte

Tabela 8.1. DPPH test etraskog ulja *Myrtus communis* L. (H.Novi)

Kolicina Ulja(μ l)	Radna konc.(μ l/ml)	Apsorbancija				Srednja vrijednost A	Inhibicija (%)
		A1	A2	A3	A4		
Kontrola		0.184	0.181	0.177	0.181	0.18075	
5	1.25	0.135	0.137	0.132		0.13467	25.496
10	2.5	0.124	0.131	0.120		0.12500	30.844
20	5	0.102	0.105	0.079		0.09533	47.257
40	10	0.069	0.068	0.063		0.06667	63.117
60	15	0.050	0.050	0.048		0.04933	72.706

Slika 8.1. DPPH test etraskog ulja *Myrtus communis* L. (H.Novi)

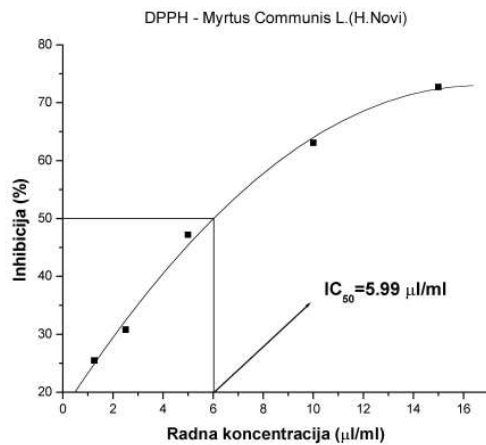


Tabela 8.2. DPPH test etraskog ulja *Myrtus communis* L. (Ulcinj)

Kolicina Ulja(μ l)	Radna konc.(μ l/ml)	Apsorbancija				Srednja vrijednost A	Inhibicija (%)
		A1	A2	A3	A4		
Kontrola		0.221	0.226	0.231	0.227	0.22625	
5	1.25	0.186	0.192	0.182		0.18667	17.4954
10	2.5	0.170	0.171	0.167		0.16933	25.1565
20	5	0.124	0.133	0.120		0.12567	44.4567
40	10	0.068	0.073	0.081		0.074	67.2928
60	15	0.037	0.031	0.033		0.03367	85.1197

Slika 8.2. DPPH test etarskog ulja *Myrtus communis* L. (Ulcinj)

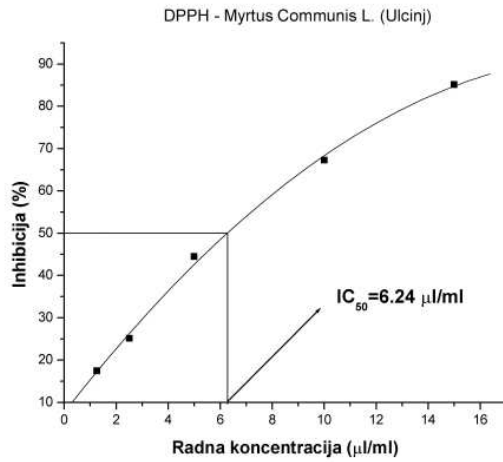


Tabela 8.3. DPPH test na standard BHA

Dodata konc. (mol/dm ³)	Radna konc.(µl/ml)	Apsorbancija				Srednja vrijednost A	Inhibicija (%)
		A1	A2	A3	A4		
Kontrola		0.196	0.197	0.195	0.196	0.19600	
0.002	5*10 ⁻⁶	0.125	0.125	0.123		0.12433	36.565
0.005	1.25*10 ⁻⁵	0.099	0.097	0.090		0.09533	51.361
0.01	2.5*10 ⁻⁵	0.063	0.057	0.055		0.05833	70.238
0.02	5*10 ⁻⁵	0.016	0.010	0.009		0.01167	94.048

Slika 8.3. DPPH test na standard BHA

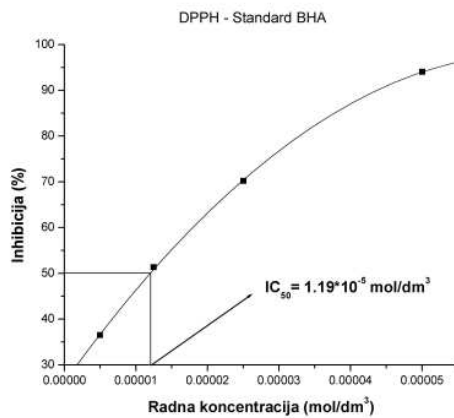


Tabela 8.4. DPPH test na standard PG

Dodata konc. (mol/dm ³)	Radna konc. (μl/ml)	Apsorbancija				Srednja vrijednost A	Inhibicija (%)
		A1	A2	A3	A4		
Kontrola		0.177	0.184	0.186	0.17	0.18150	
0.0005	1.25*10 ⁻⁶	0.154	0.155	0.148		0.15233	16.070
0.001	2.5*10 ⁻⁶	0.135	0.133	0.129		0.13233	27.089
0.002	5*10 ⁻⁶	0.103	0.105	0.093		0.10033	44.720
0.005	1.25*10 ⁻⁵	0.026	0.043	0.021		0.03000	83.471
0.01	2.5*10 ⁻⁵	0.011	0.013	0.011		0.01167	93.572

Slika 8.4. DPPH test na standard PG

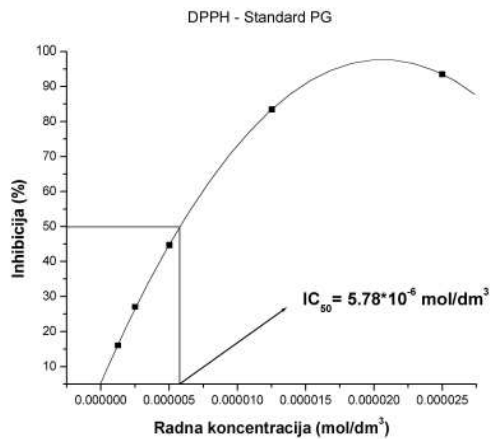


Tabela 8.5. Uticaj etarskog ulja *Myrtus communis* L. (H.Novi) na lipidnu peroksidaciju

Kolicina Ulja(μl)	Radna konc.(μl/ml)	Apsorbancija				Srednja vrijednost A	Inhibicija (%)
		A1	A2	A3	A4		
Kontrola		0.444	0.435	0.477		0.45200	
2.5	0.83333	0.319	0.330	0.334		0.32767	27.507
5	1.66667	0.286	0.315	0.326		0.30900	31.637
10	3.33333	0.269	0.314	0.268		0.28367	37.242
20	6.66667	0.261	0.247	0.261		0.25633	43.289
40	13.33333	0.309	0.349	0.339		0.33233	26.475

Slika 8.5. Uticaj etarskog ulja *Myrtus communis* L. (H.Novi) na lipidnu peroksidaciju

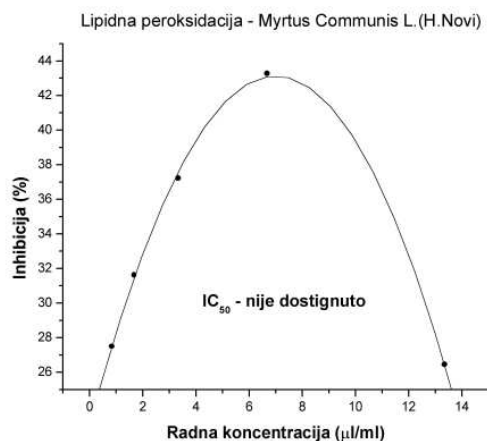
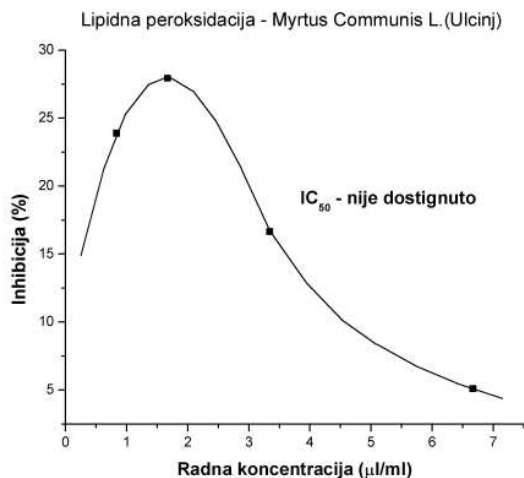


Tabela 8.6. Uticaj etarskog ulja *Myrtus communis* L. (Ulcinj) na lipidnu peroksidaciju

Kolicina Ulja(µl)	Radna konc.(µl/ml)	Apsorbancija				Srednja vrijednost A	Inhibicija (%)
		A1	A2	A3	A4		
Kontrola		0.443	0.463	0.425		0.44367	
2.5	0.83333	0.341	0.345	0.327		0.33767	23.892
5	1.66667	0.305	0.333	0.321		0.31967	27.949
10	3.33333	0.380	0.335	0.394		0.36967	16.680
20	6.66667	0.426	0.430	0.407		0.42100	5.110

Slika 8.6. Uticaj etarskog ulja *Myrtus communis* L. (Ulcinj) na lipidnu peroksidaciju



8.2. Antioksidantna aktivnost ekstrakata mirte

Tabela 8.7. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Bar)

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.5	12.50	0.017	0.019	0.019	0.01833	91.7231
0.15	3.75	0.026	0.030	0.032	0.02933	86.75696
0.1	2.50	0.096	0.091	0.081	0.08933	59.66892
0.05	1.25	0.144	0.117	0.118	0.1175	46.9526
kontrola		0.216	0.220	0.227	0.223	0.2215

Slika 8.7. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Bar)

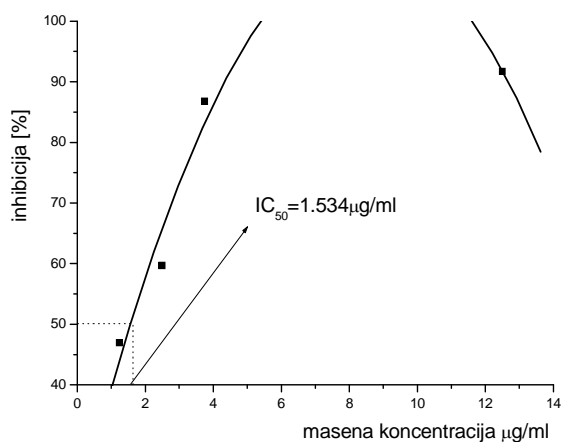


Tabela 8.8. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Ulcinj)

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.25	6.25	0.017	0.012	0.016	0.015	93.07
0.15	3.75	0.021	0.022	0.021	0.02133	90.14
0.1	2.50	0.058	0.075	0.071	0.068	68.57
0.05	1.25	0.144	0.139	0.123	0.13533	37.44
0.025	0.625	0.192	0.199	0.202	0.19767	8.63
kontrola		0.200	0.211	0.223	0.215	0.21633

Slika 8.8. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Ulcinj)

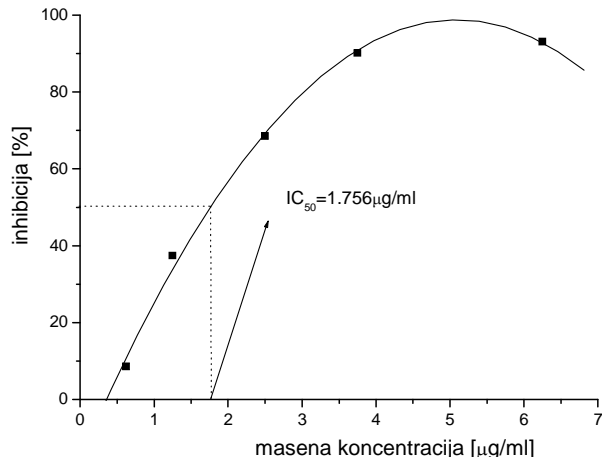


Tabela 8.9. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Tivat)

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.25	6.25	0.020	0.015	0.016	0.017	92.46955
0.15	3.75	0.036	0.028	0.032	0.032	85.82503
0.1	2.50	0.093	0.095	0.090	0.09267	58.95164
0.05	1.25	0.155	0.168	0.163	0.162	28.2392
kontrola	0.221	0.230	0.220	0.232	0.22575	

Slika 8.9. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Tivat)

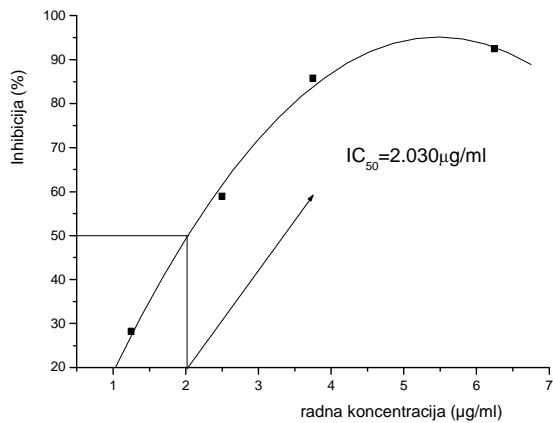


Tabela 8.10. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Kotor)

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.25	6.25	0.018	0.018	0.018	0.018	91.66667
0.15	3.75	0.027	0.028	0.035	0.03	86.11111
0.1	2.50	0.092	0.092	0.095	0.093	56.94444
0.05	1.25	0.158	0.158	0.157	0.15767	27.00617
kontrola		0.208	0.214	0.216	0.218	

Slika 8.10. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Kotor)

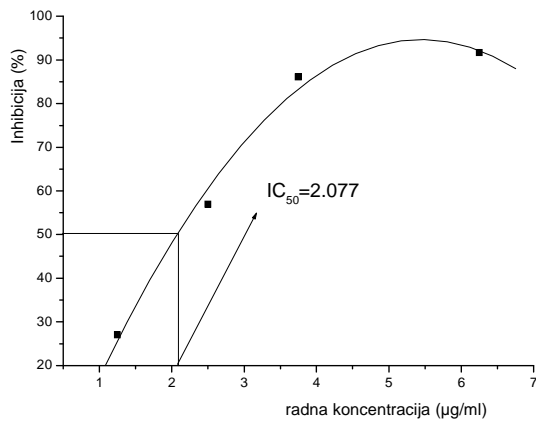


Tabela 8.11. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (H.Novi)

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.25	6.25	0.009	0.010	0.011	0.01	95.51066
0.15	3.75	0.024	0.023	0.031	0.026	88.32772
0.1	2.50	0.075	0.075	0.078	0.076	65.88103
0.05	1.25	0.142	0.157	0.157	0.152	31.76207
0.025	0.625	0.181	0.176	0.181	0.17933	19.49121
kontrola		0.217	0.220	0.223	0.231	0

Slika 8.11. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (H.Novi)

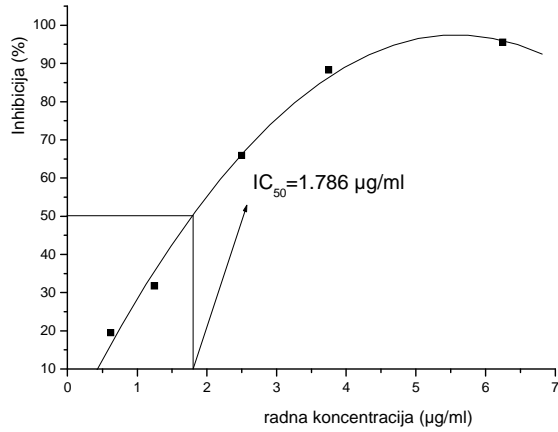


Tabela 8.12. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Budva)

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]	
0.25	6.25	0.016	0.020	0.018	0.018	92.61538	
0.15	3.75	0.027	0.023	0.027	0.02567	89.47009	
0.1	2.50	0.096	0.086	0.076	0.086	64.71795	
0.05	1.25	0.173	0.173	0.173	0.173	29.02564	
0.025	0.625	0.191	0.199	0.193	0.19433	20.2735	
kontrola		0.231	0.247	0.246	0.251	0.24375	0

Slika 8.12. DPPH test metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Budva)

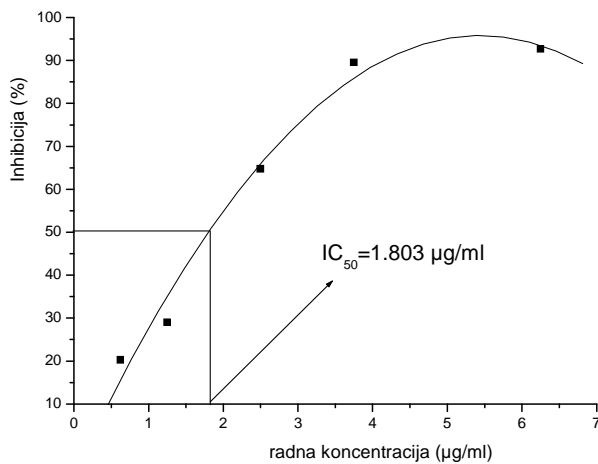


Tabela 8.13. DPPH test na standard BHT

Dodata konc. (mol/dm ³)	Radna konc.(µl/ml)	Apsorbancija				Srednja vrijednost A	Inhibicija (%)
		A1	A2	A3	A4		
Kontrola		0.258	0.239	0.249	0.233	0.24475	
0.005	1.25*10 ⁻⁵	0.211	0.207	0.193		0.20367	16.786
0.01	2.5*10 ⁻⁵	0.178	0.177	0.182		0.17900	26.864
0.02	5*10 ⁻⁵	0.152	0.146	0.139		0.14567	40.483
0.04	1*10 ⁻⁴	0.102	0.101	0.103		0.10200	58.325

Slika 8.13. DPPH test na standard BHT

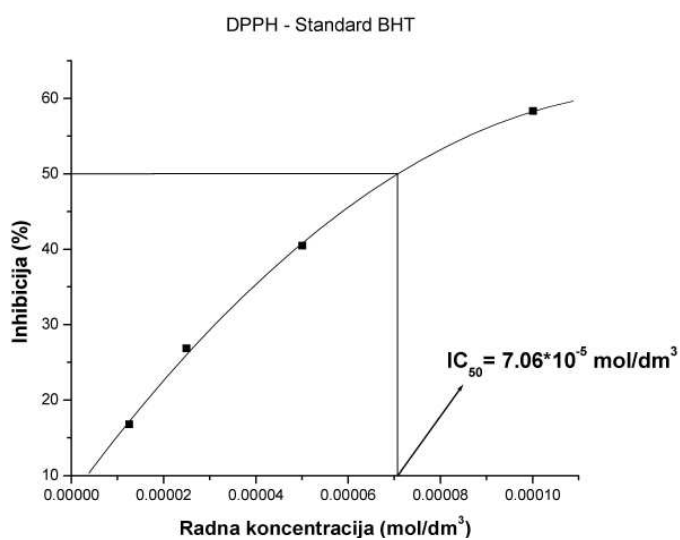


Tabela 8.14. DPPH test na standard BHA

Dodata konc. (mol/dm ³)	Radna konc.(µl/ml)	Apsorbancija				Srednja vrijednost A	Inhibicija (%)
		A1	A2	A3	A4		
Kontrola		0.196	0.197	0.195	0.196	0.19600	
0.002	5*10 ⁻⁶	0.125	0.125	0.123		0.12433	36.565
0.005	1.25*10 ⁻⁵	0.099	0.097	0.090		0.09533	51.361
0.01	2.5*10 ⁻⁵	0.063	0.057	0.055		0.05833	70.238
0.02	5*10 ⁻⁵	0.016	0.010	0.009		0.01167	94.048

Slika 8.14. DPPH test na standard BHA

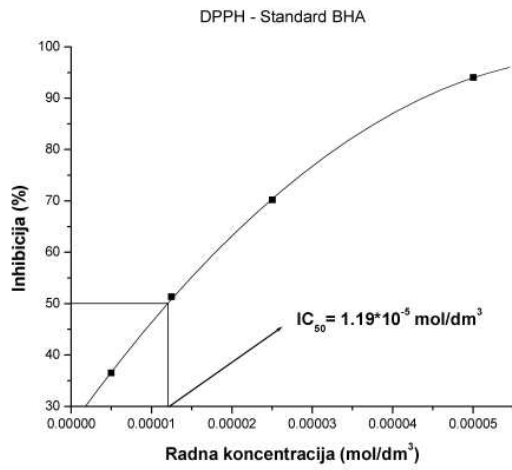


Tabela 8.15. DPPH test na standard PG

Dodata konc. (mol/dm ³)	Radna konc. (μl/ml)	Apsorbancija				Srednja vrijednost A	Inhibicija (%)
		A1	A2	A3	A4		
Kontrola		0.177	0.184	0.186	0.179	0.18150	
0.0005	1.25*10 ⁻⁶	0.154	0.155	0.148		0.15233	16.070
0.001	2.5*10 ⁻⁶	0.135	0.133	0.129		0.13233	27.089
0.002	5*10 ⁻⁶	0.103	0.105	0.093		0.10033	44.720
0.005	1.25*10 ⁻⁵	0.026	0.043	0.021		0.03000	83.471
0.01	2.5*10 ⁻⁵	0.011	0.013	0.011		0.01167	93.572

Slika 8.15. DPPH test na standard PG

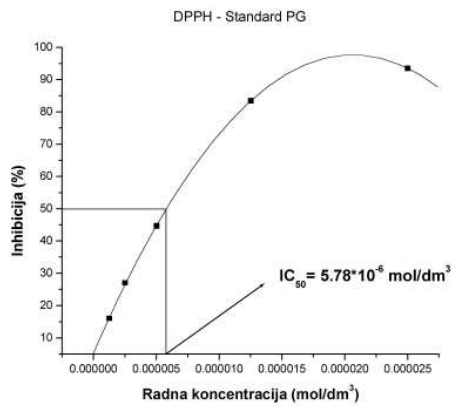


Tabela 8.16. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Ulcinj) na inhibiciju OH radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
20	666.66	0.081	0.076	0.076	0.07767	68.65
15	500	0.093	0.086	0.081	0.08667	65.08
10	333.33	0.096	0.101	0.100	0.099	60.02
7.5	250	0.122	0.117	0.120	0.11967	51.77
5	166.65	0.141	0.141	0.147	0.143	42.31
kontrola		0.253	0.280	0.220	0.238	0.24775

Slika 8.16 Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Ulcinj) na inhibiciju OH radikala

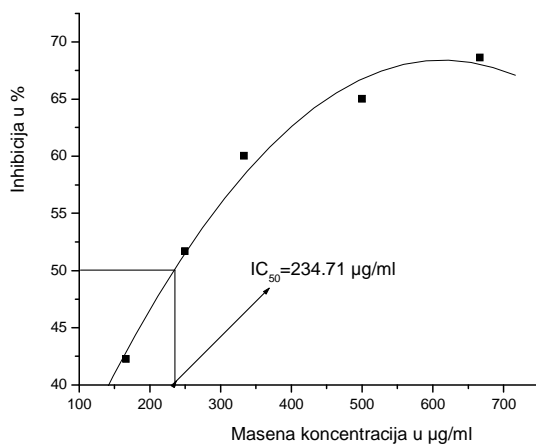


Tabela 8.17. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Bar) na inhibiciju OH radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
20	666.66	0.196	0.181	0.190	0.189	61.57
15	500	0.191	0.205	0.184	0.19333	60.83
10	333.33	0.236	0.226	0.214	0.22533	54.56
7.5	250	0.265	0.270	0.258	0.26433	46.34
5	166.65	0.309	0.322	0.310	0.31367	36.49
kontrola		0.502	0.524	0.490	0.460	0.494

Slika 8.17. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Bar) na inhibiciju OH radikala

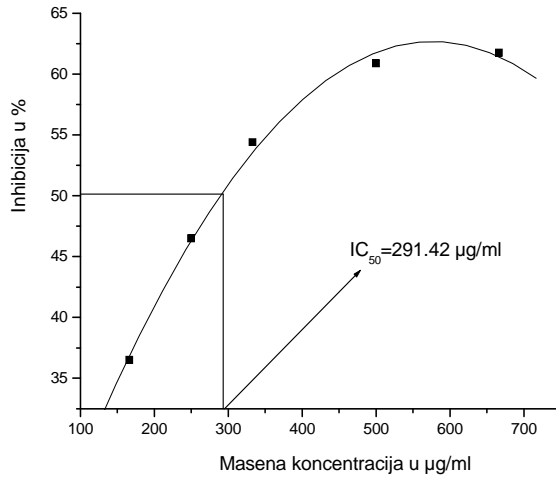


Tabela 8.18. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Budva) na inhibiciju OH radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
20	666.66	0.084	0.075	0.096	0.085	66.64
15	500	0.087	0.086	0.090	0.08767	65.67
10	333.33	0.104	0.110	0.103	0.10567	58.43
7.5	250	0.138	0.131	0.116	0.12833	50.00
5	166.65	0.155	0.160	0.153	0.156	38.97
kontrola		0.246	0.260	0.260	0.256	0.2555

Slika 8.18. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Budva) na inhibiciju OH radikala

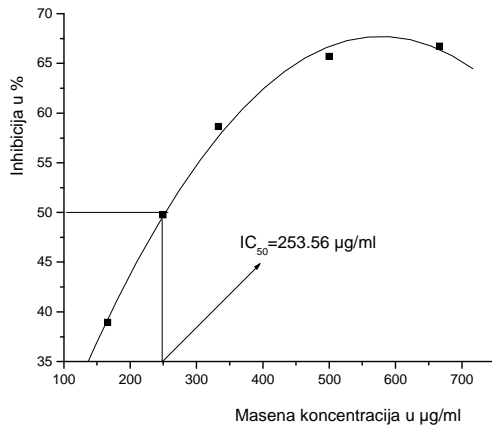


Tabela 8.19. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Tivat) na inhibiciju OH radikal

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
20	666.66	0.154	0.161	0.168	0.161	63.32
15	500	0.170	0.170	0.183	0.17433	60.59
10	333.33	0.219	0.215	0.188	0.20733	52.72
7.5	250	0.236	0.232	0.246	0.238	45.64
5	166.65	0.282	0.276	0.287	0.28167	35.67
kontrola		0.476	0.470	0.418	0.389	0.43825

Slika 8.19 Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Tivat) na inhibiciju OH radikal

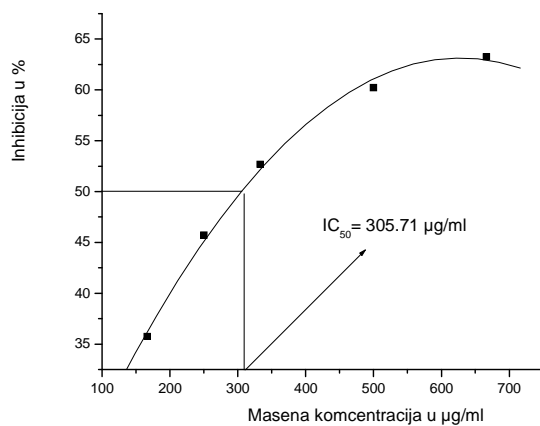


Tabela 8.20. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Kotor) na inhibiciju OH radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
20	666.66	0.153	0.147	0.147	0.149	66.28959
15	500	0.163	0.155	0.151	0.15633	64.63047
10	333.33	0.205	0.208	0.189	0.20067	54.6003
7.5	250	0.224	0.236	0.225	0.22833	48.34087
5	166.65	0.269	0.277	0.261	0.269	39.14027
kontrola		0.458	0.461	0.407	0.442	--

Slika 8.20. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Kotor) na inhibiciju OH radikala

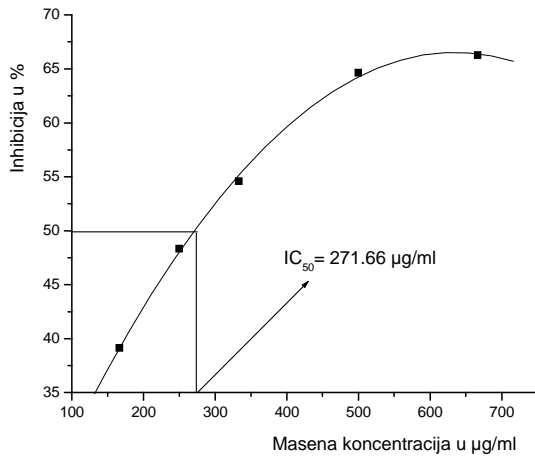


Tabela 8.21. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (H.Novi) na inhibiciju OH radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
20	666.66	0.145	0.129	0.154	0.14267	64.56983
15	500	0.142	0.146	0.147	0.145	63.99036
10	333.33	0.171	0.179	0.159	0.16967	57.86459
7.5	250	0.199	0.203	0.196	0.19933	50.4971
5	166.65	0.258	0.246	0.239	0.24767	38.49389
kontrola		0.373	0.431	0.404	0.40267	--

Slika 8.21. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (H.Novi) na inhibiciju OH radikala

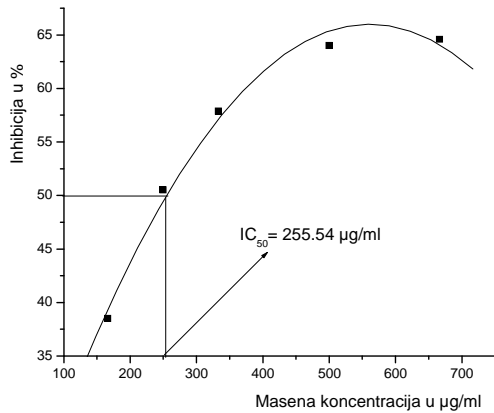


Tabela 8.22. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Ulcinj) na inhibiciju NO radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
30	1000	0.120	0.119	0.128	0.12233	57.26
25	833.3	0.140	0.136	0.139	0.13833	51.70
22.5	750	0.120	0.110	0.116	0.11533	59.70
20	666.6	0.167	0.147	0.157	0.157	45.13
15	500	0.181	0.165	0.176	0.174	39.21
kontrola		0.342	0.290	0.266	0.246	

Slika 8.22. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Ulcinj) na inhibiciju NO radikala

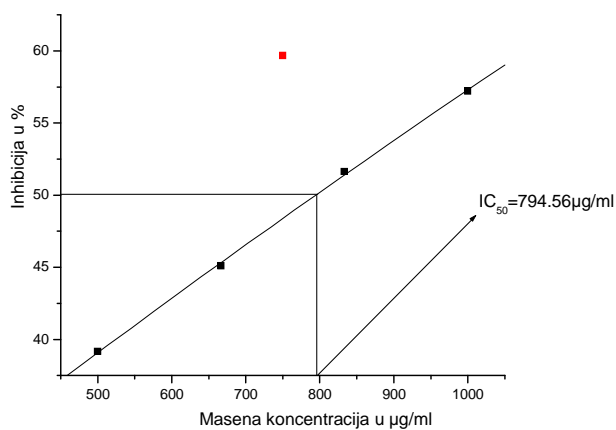


Tabela 8.23. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Bar) na inhibiciju NO radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
30	1000	0.195	0.186	0.182	0.18767	51.59
25	833.3	0.213	0.211	0.204	0.20933	45.93
22.5	750	0.224	0.215	0.223	0.22067	43.02
20	666.6	0.229	0.211	0.233	0.22433	42.06
15	500	0.245	0.219	0.238	0.234	39.52
kontrola		0.458	0.349	0.377	0.365	

Slika 8.23. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Bar) na inhibiciju NO radikala

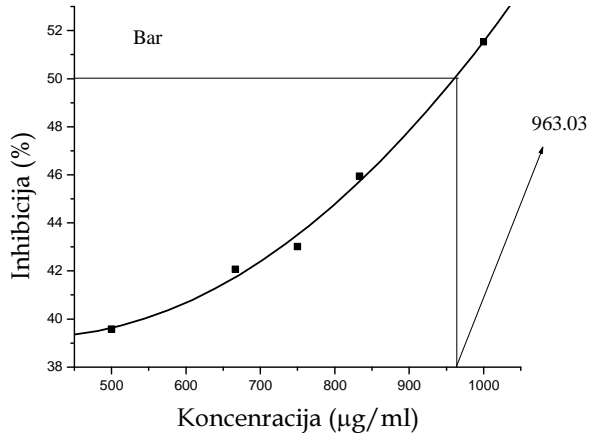


Tabela 8.24. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Budva) na inhibiciju NO radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
30	1000	0.170	0.169	0.172	0.17033	55.07
25	833.3	0.172	0.170	0.182	0.17467	53.92
22.5	750	0.175	0.168	0.178	0.17367	54.19
20	666.6	0.178	0.174	0.185	0.179	52.73
15	500	0.188	0.191	0.201	0.19333	48.98
kontrola		0.438	0.374	0.371	0.334	0.37925

Slika 8.24. metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Budva) na inhibiciju NO radikala

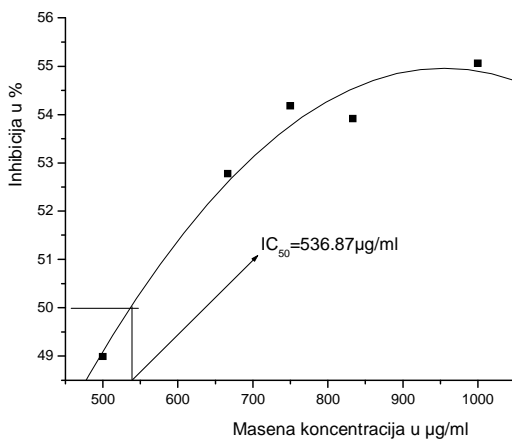


Tabela 8.25. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Tivat) na inhibiciju NO radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
30	1000	0.143	0.146	0.172	0.15367	52.97
25	833.3	0.153	0.152	0.213	0.1525	53.08
22.5	750	0.165	0.175	0.214	0.18467	44.83
20	666.6	0.186	0.175	0.218	0.193	42.85
15	500	0.203	0.205	0.236	0.21467	33.72
kontrola		0.312	0.317	0.349	0.450	0.326

Slika 8.25. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Tivat) na inhibiciju NO radikala

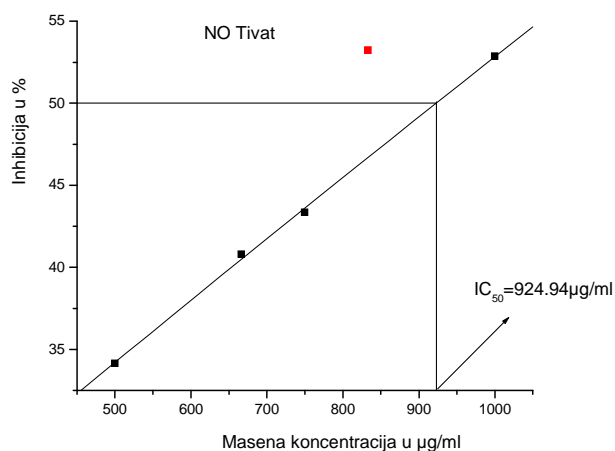


Tabela 8.26 Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Kotor) na inhibiciju NO radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
30	1000	0.120	0.135	0.158	0.13767	53.88
25	833.3	0.167	0.160	0.183	0.17	42.96
22.5	750	0.171	0.178	0.215	0.188	37.03
20	666.6	0.192	0.195	0.229	0.20533	31.11
15	500	0.250	0.227	0.253	0.24333	18.54
kontrola		0.360	0.266	0.254	0.313	0.29825

Slika 8.26. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Kotor) na inhibiciju NO radikala

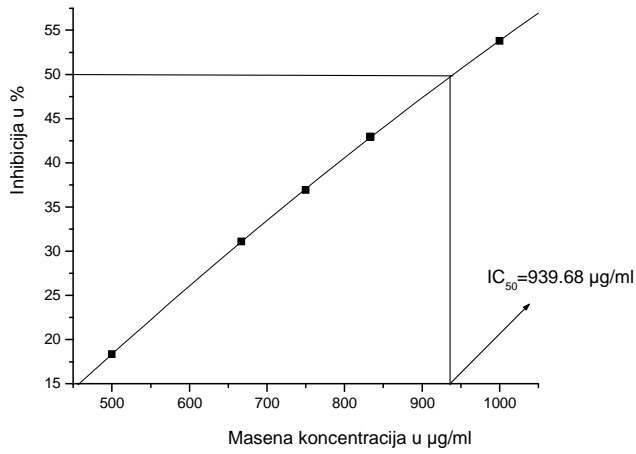
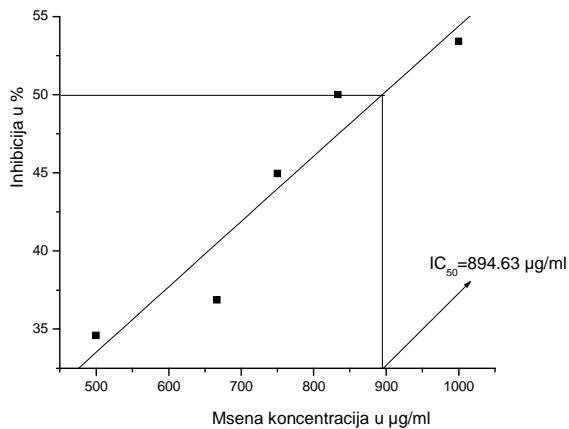


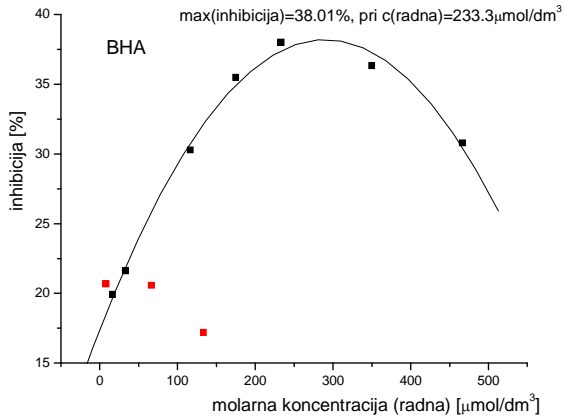
Tabela 8.27. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (H.Novi) na inhibiciju NO radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
		0.114	0.123	0.132		
30	1000	0.114	0.123	0.132	0.123	53.39
25	833.3	0.112	0.133	0.151	0.132	49.98
22.5	750	0.144	0.143	0.149	0.14533	44.93
20	666.6	0.180	0.155	0.165	0.16667	36.88
15	500	0.172	0.168	0.178	0.17267	34.65
kontrola		0.239	0.242	0.255	0.320	0.264

Slika 8.27. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (H.Novi) na inhibiciju NO radikala



Slika 8.28. Uticaj BHA na inhibiciju NO radikala



Slika 8.29. Uticaj BHT na inhibiciju NO radikala

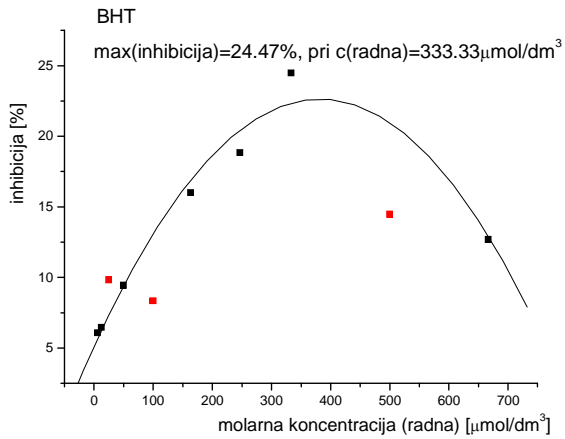
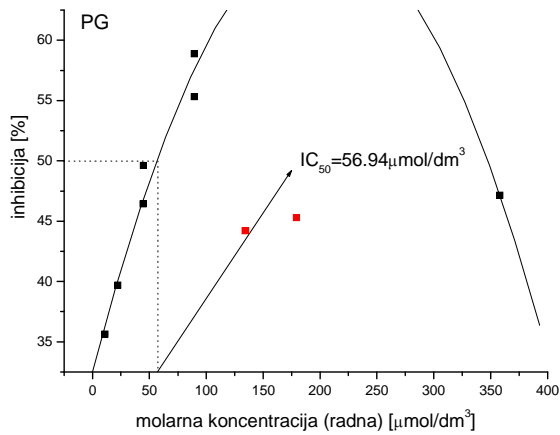


Tabela 8.28. Uticaj PG na inhibiciju NO radikala

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [μ g/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.125	8.3	0.087	0.090	0.090	0.089	75.68
0.0625	4.15	0.095	0.100	0.100	0.09833	73.42
0.031	2.075	0.090	0.090	0.091	0.09033	77.16
0.015	1.037	0.085	0.085	0.084	0.08467	75.47
0.0075	0.518	0.134	0.180	0.190	0.168	54.30
0.0037	0.259	0.270	0.290	0.304	0.288	21.88
kontrola	0.350	0.380	0.372	0.370	0.368	

Slika 8.30. Uticaj PG na inhibiciju NO radikala



Slika 8.31. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. - H.Novi

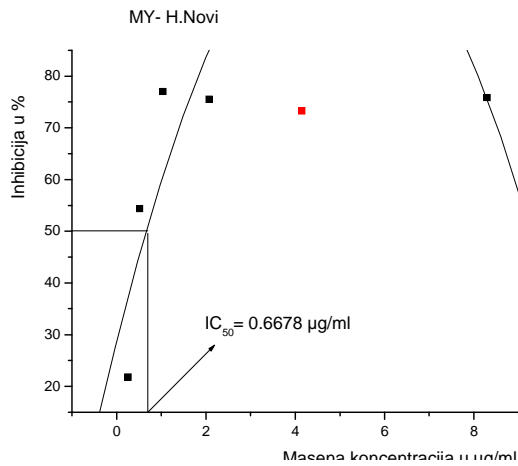


Tabela 8.29. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. - Ulcinj

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [μg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.015	1	0.049	0.057		0.053	80.65
0.0112	0.75	0.045	0.051		0.048	82.53
0.0075	0.50	0.048	0.054		0.051	81.28
0.0057	0.38	0.073	0.076		0.0745	72.56
0.0037	0.25	0.189	0.151		0.17	37.65
kontrola		0.250	0.294		0.272	

Slika 8.32. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. - Ulcinj

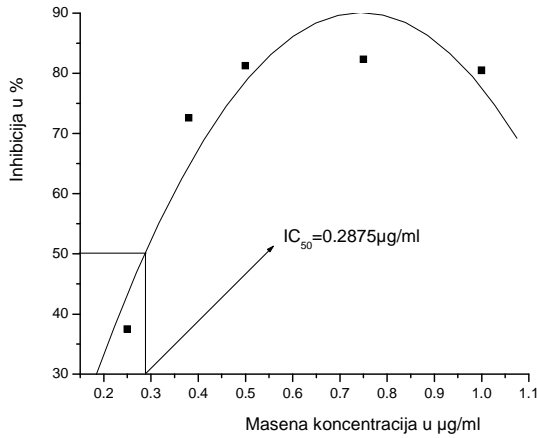


Tabela 8.30. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. - Budva

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.031	2.06	0.043	0.041	0.040	0.04133	73.92219
0.015	1.03	0.049	0.070	0.045	0.05467	65.50999
0.0075	0.515	0.072	0.063	0.066	0.067	57.72871
0.0037	0.2575	0.138	0.066	0.065	0.08967	43.42797
0.00185	0.1287	0.108	0.099	0.114	0.107	32.49211
kontrola		0.177	0.151	0.145	0.1585	--

Slika 8.33. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. - Budva

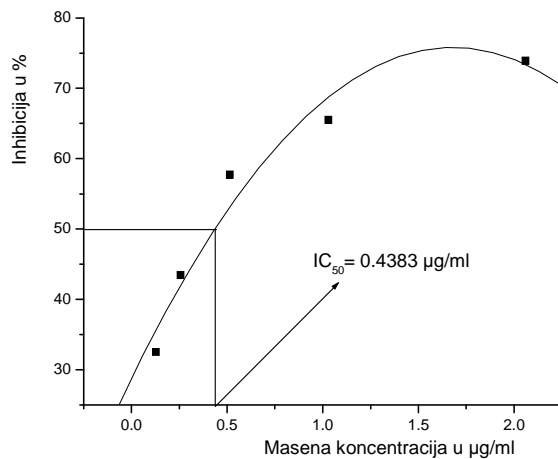


Tabela 8.31. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. – Bar

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]		
		0.017	0.019	0.013				
0.031	2.06	0.017	0.019	0.013	0.01633	83.0303		
0.015	1.03	0.017	0.033	0.047	0.03233	66.40693		
0.0075	0.515	0.059	0.061	0.062	0.06067	36.9697		
0.0037	0.2575	0.078	0.080	0.086	0.08133	15.49784		
0.00185	0.1287	0.101	0.081	0.071	0.08433	12.38095		
kontrola		0.09	9	0.090	0.096	0.100	0.09625	--

Slika 8.34. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. – Bar

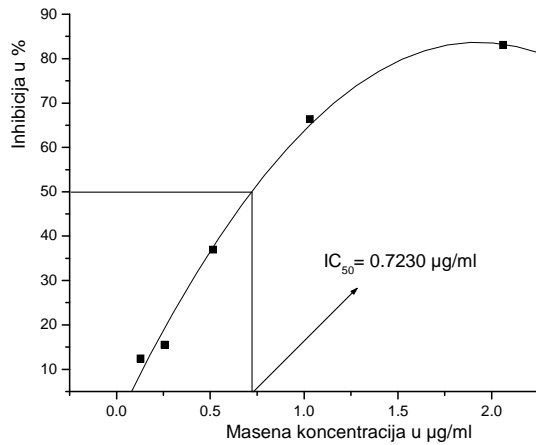


Tabela 8.32. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. - Kotor

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]	
		0.126	0.136	0.120			
0.031	2.06	0.126	0.136	0.120	0.12733	69.24316	
0.015	1.03	0.230	0.205	0.228	0.221	46.61836	
0.0075	0.515	0.221	0.211	0.257	0.22967	44.52496	
0.0037	0.2575	0.370	0.398		0.384	7.24638	
0.00185	0.1287	0.284	0.341	0.319	0.31467	23.99356	
kontrola		0.281	0.430	0.487	0.458	0.414	--

Slika 8.35. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. - Kotor

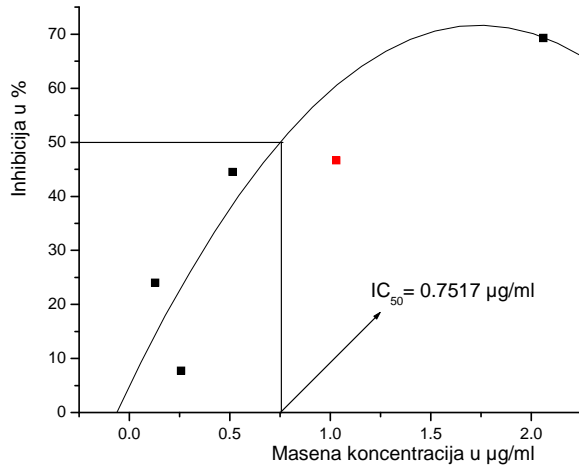


Tabela 8.33. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. - Tivat

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.031	2.06	0.232	0.256	0.183	0.22367	46.10442
0.015	1.03	0.164	0.140	0.166	0.15667	62.249
0.0075	0.515	0.171	0.168	0.176	0.17167	58.63454
0.0037	0.2575	0.169	0.146	0.153	0.156	62.40964
0.00185	0.1287	0.322	0.323	0.373	0.33933	18.23293
kontrola	0.438	0.422	0.400	0.400	0.415	--

Slika 8.36. Inhibicija superoksid anjona, *Myrtus communis* L. - Tivat

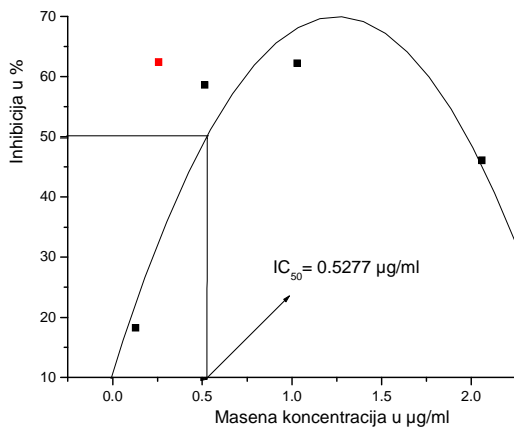


Tabela 8.34. Uticaj PG na inhibiciju superoksid anjona

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
0.0191	1.27	0.070	0.072	0.076	0.07267	72.95621
0.00955	0.0635	0.135	0.143	0.140	0.13933	48.14539
0.00477	0.03175	0.124	0.170	0.184	0.15933	40.70215
0.00238	0.0158	0.211	0.207	0.157	0.19167	28.6689
0.00119	0.00793	0.229	0.215	0.235	0.22633	15.76727
kontrola		0.285	0.260	0.279	0.251	--

Slika 8.37. Uticaj PG na inhibiciju superoksid anjona

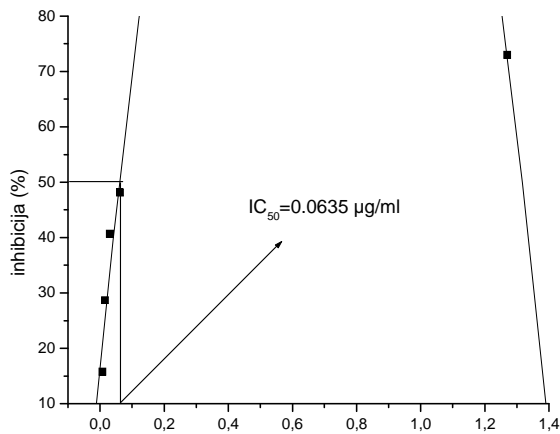


Tabela 8.35. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Tivat) na lipidnu peroksidaciju

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A] Tivat, My			\bar{A}	Inhibicija [%]
10	333.33	0.127	0.116	0.129	0.124	75.34
5	166.67	0.135	0.176	0.174	0.16167	67.84
2.5	83.33	0.273	0.308	0.280	0.287	42.91
1	33.33	0.319	0.347	0.294	0.32	36.35
0.5	16.67	0.388	0.453	0.453	0.43133	14.20
kontrola		0.50	0.493	0.516	0.499	0.50275

Slika 8.38. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Tivat) na lipidnu peroksidaciju

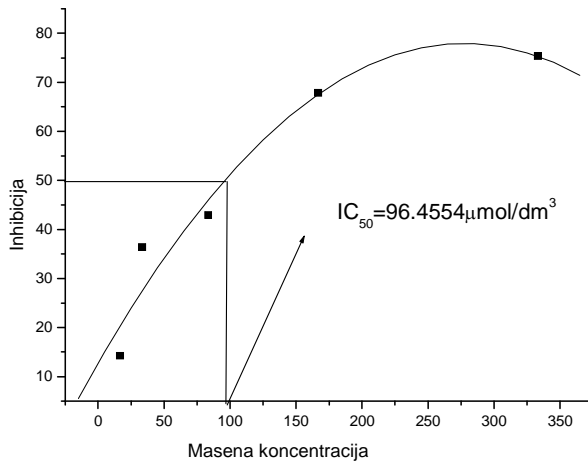


Tabela 8.36. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Bar) na lipidnu peroksidaciju

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [μg/ml]	Apsorpcija [A] Bar			\bar{A}	Inhibicija [%]
10	333.33	0.081	0.081	0.089	0.08367	81.28262
5	166.67	0.148	0.153	0.118	0.1505	66.3311
2.5	83.33	0.188	0.198	0.192	0.19267	56.89784
1	33.33	0.298	0.246	0.283	0.2905	35.01119
0.5	16.67	0.330	0.327	0.321	0.326	27.06935
kontrola		0.46	0.435	0.422	0.470	0.447

Slika 8.39. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Bar) na lipidnu peroksidaciju

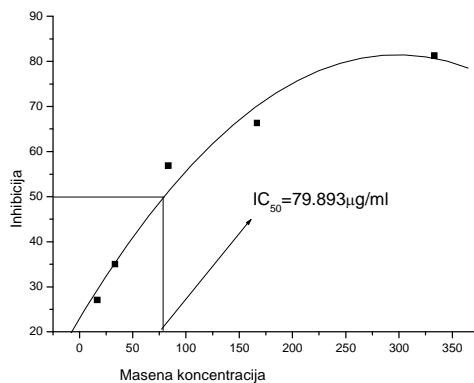


Tabela 8.37. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (H.Novi) na lipidnu peroksidaciju

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A] Kotor			\bar{A}	Inhibicija [%]
		0.084	0.097	0.110		
10	333.33	0.084	0.097	0.110	0.097	75.87065
5	166.67	0.128	0.123	0.129	0.12667	68.49088
2.5	83.33	0.224	0.227	0.211	0.22067	45.10779
1	33.33	0.270	0.243	0.261	0.258	35.8209
0.5	16.67	0.295	0.305	0.326	0.30867	23.21725
kontrola		0.400	0.410	0.398	0.40267	

Slika 8.40. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (H.Novi) na lipidnu peroksidaciju

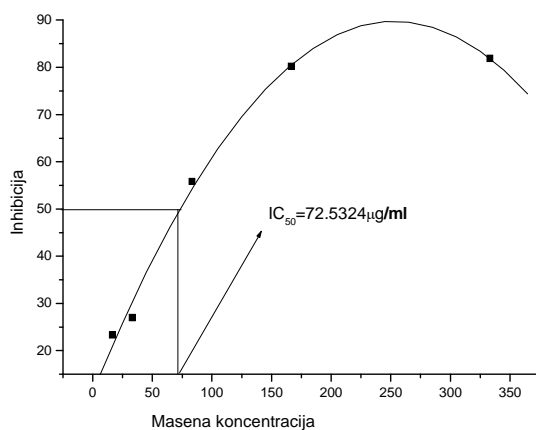


Tabela 8.38. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Kotor) na lipidnu peroksidaciju

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A] H.Novi			\bar{A}	Inhibicija [%]
		0.098	0.070	0.078		
10	333.33	0.098	0.070	0.078	0.082	81.85841
5	166.67	0.082	0.092	0.094	0.08933	80.23599
2.5	83.33	0.180	0.219	0.200	0.19967	55.82596
1	33.33	0.301	0.320	0.369	0.33	26.99115
0.5	16.67	0.348	0.354	0.338	0.34667	23.30383
kontrola		0.45	0.452	0.455	0.325	0.45267

Slika 8.41. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Kotor) na lipidnu peroksidaciju

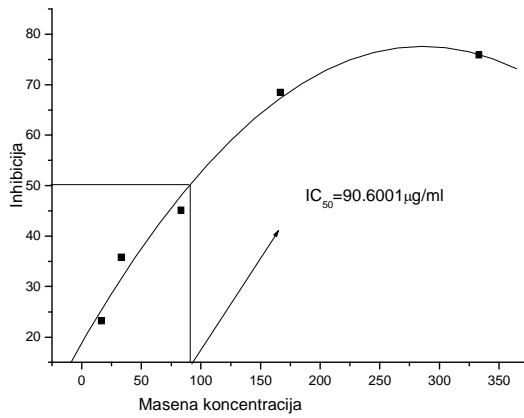


Tabela 8.39. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Budva) na lipidnu peroksidaciju

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [µg/ml]	Apsorpcija [A] Ulcinj			\bar{A}	Inhibicija [%]
10	333.33	0.089	0.083	0.097	0.08967	79.38697
5	166.67	0.148	0.143	0.153	0.148	65.97701
2.5	83.33	0.241	0.277	0.220	0.246	43.44828
1	33.33	0.301	0.310	0.286	0.299	31.26437
0.5	16.67	0.334	0.341	0.374	0.34967	19.61686
kontrola	0.432	0.422	0.453	0.435	0.4355	

Slika 8.42. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Budva) na lipidnu peroksidaciju

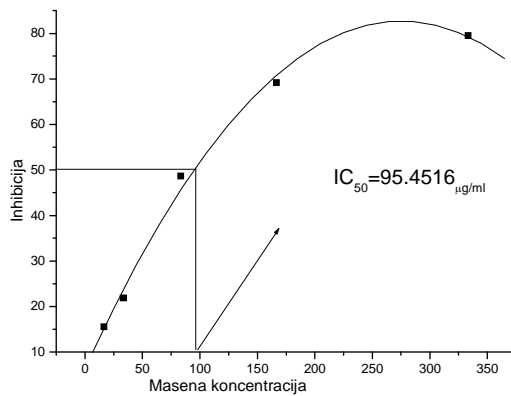


Tabela 8.40. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Ulcinj) na lipidnu peroksidaciju

Masena koncentracija [%]	Radna koncentracija [$\mu\text{g/ml}$]	Apsorpcija [A] Budva			\bar{A}	Inhibicija [%]
10	333.33	0.096	0.082	0.076	0.08467	79.4996
5	166.67	0.116	0.132	0.134	0.12733	69.16868
2.5	83.33	0.210	0.231	0.195	0.212	48.66828
1	33.33	0.312	0.312	0.344	0.32267	21.87248
0.5	16.67	0.332	0.417	0.366	0.349	15.49637
kontrola		0.39	0.426	0.416	0.493	0.413

Slika 8.43. Uticaj metanolnih ekstrakata *Myrtus communis* L. (Ulcinj) na lipidnu peroksidaciju

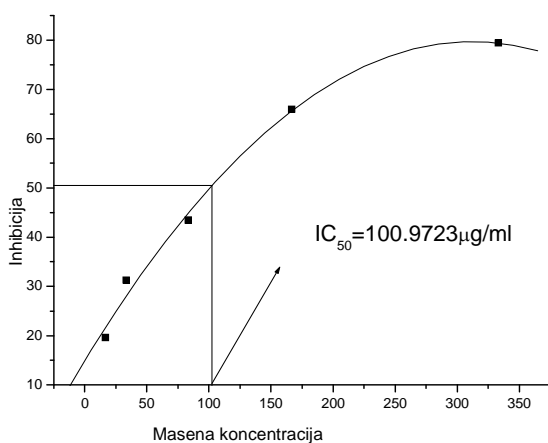
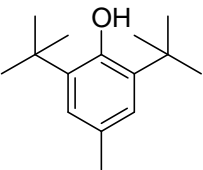


Tabela 8.41. Uticaj BHT na lipidnu peroksidaciju

 $M=220.4 \text{ g/mol}$	Molarna koncentracija [mol/dm^3]	Radna koncentracija [$\mu\text{mol/dm}^3$]	Apsorbancija [A]			\bar{A}	Inhibicija [%]
	0.02	66.67	0.064	0.079	0.065	0.069	84.03
	0.0016	5.33	0.343	0.357	0.352	0.351	19.01
	0.0012	4.0	0.372	0.369	0.361	0.367	15.16
	0.0008	2.67	0.338	0.387	0.386	0.386	10.74
	0.0006	2.0	0.392	0.397	0.395	0.395	8.85
	0.0004	1.33	0.420	0.409	0.416	0.415	4.16
	kontrola		0.455	0.420	0.430	0.427	0.433

Slika 8.44. Uticaj BHT na lipidnu peroksidaciju

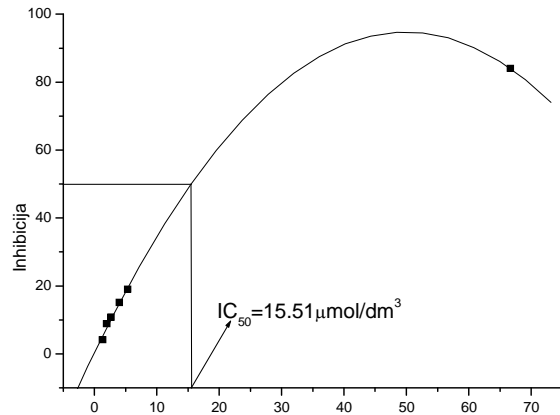
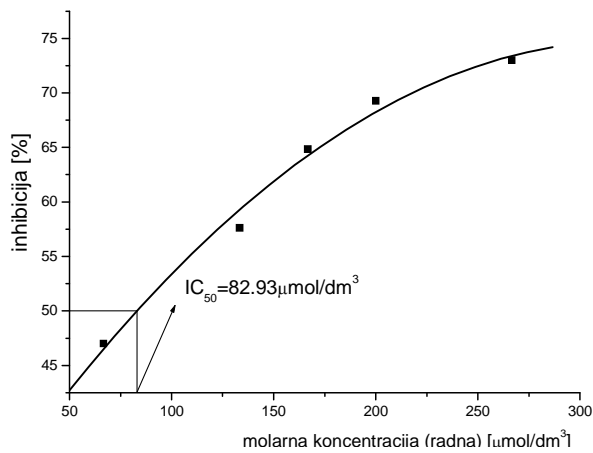


Tabela 8.42. Uticaj PG na lipidnu peroksidaciju

<chem>CC(=O)Oc1cc(O)c(O)c(O)c1</chem> M= 212.20 g/mol	Molarna koncentracija [mol/dm ³]	Radna koncentracija [μmol/dm ³]	Apsorbancija [A]			$\bar{\lambda}$	Inhibicija [%]
	0.08	266.67	0.110	0.103	0.105	0.106	72.99
	0.06	200.00	0.125	0.117	0.120	0.12067	69.26
	0.05	166.67	0.134	0.130	0.150	0.138	64.84
	0.04	133.33	0.174	0.153	0.172	0.16633	57.62
	0.02	66.67	0.215	0.219	0.190	0.208	47.01
kontrola		0.372	0.417	0.375	0.406	0.3925	

Slika 8.45. Uticaj PG na lipidnu peroksidaciju



Slika 8.46. Kalibraciona kriva standardnog rastvora rutina

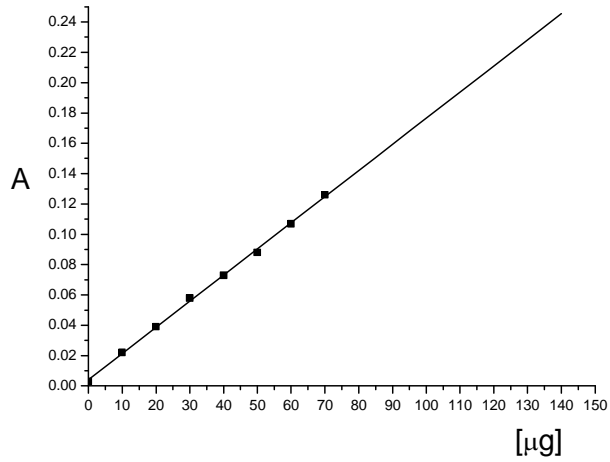


Tabela 8.43. Količina ukupnih flavonoida u metanolnim ekstraktima mirte

Lokalitet	\bar{A}	Očitano sa grafika [μg]	Razblaženje	Ukupni flavonoidi [mg/100g ekstrakta]
Ulcinj	0.219	124.74	4989.6	4.99
Bar	0.164	92.65	3706.0	3.71
Budva	0.192	109.01	4360.0	4.36
Kotor	0.190	107.97	4318.8	4.32
Tivat	0.185	104.94	4197.6	4.20
H.Novi	0.169	94.45	3776.0	3.78

Slika 8.47. Kalibraciona kriva standardnog rastvora hlorogenske kiseline

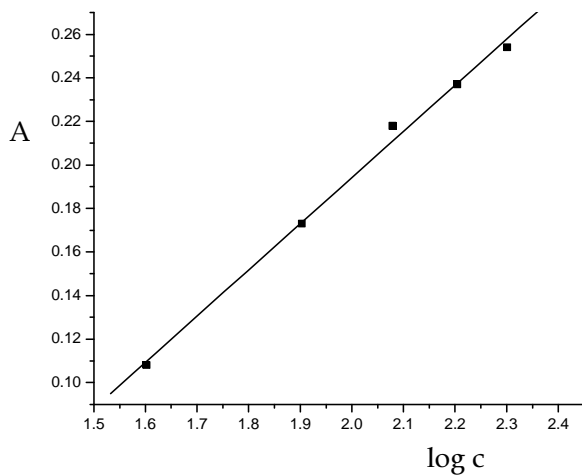
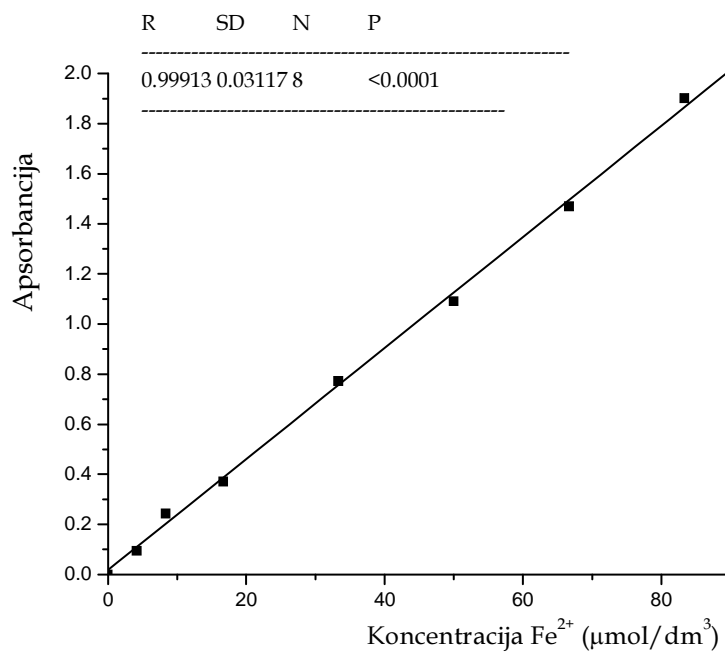


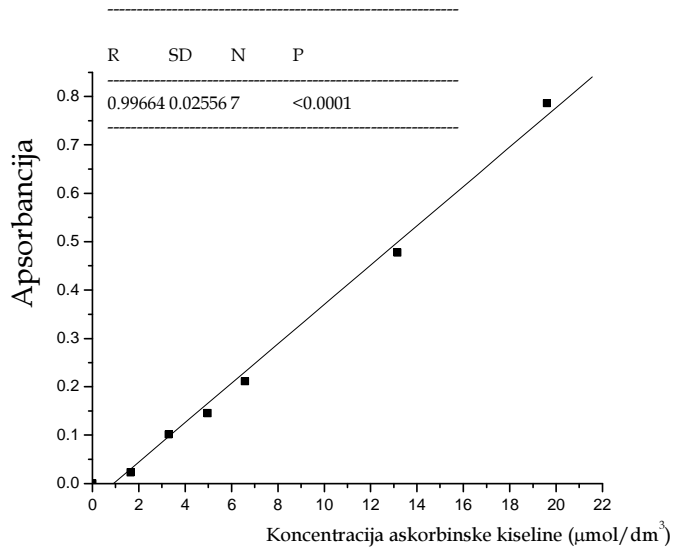
Tabela 8.44. Količina ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima mirte

Lokalitet	$\bar{\lambda}$ [nm]	Očitano sa grafika [log c]	Razblaženje	Ukupni fenoli [mg/100g ekstrakta]
Ulcinj	0.170	1.886	1922.8	1.92
Bar	0.181	1.938	2167.4	2.17
Budva	0.174	1.906	2013.4	2.01
Kotor	0.174	1.906	2013.4	2.01
Tivat	0.165	1.864	1827.8	1.83
H.Novi	0.197	2.016	2593.8	2.59

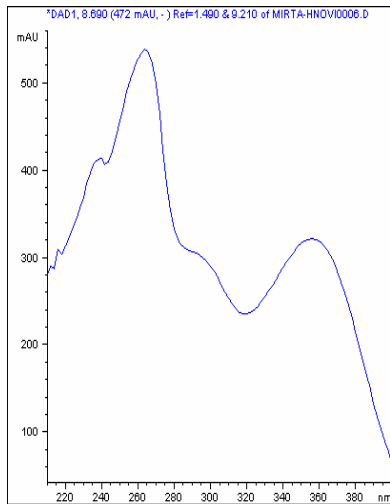
Slika 8.48. Kalibraciona kriva standardnog rastvora Fe^{2+}



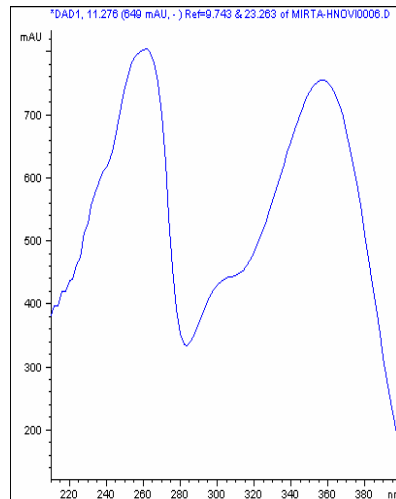
Slika 8.49. Kalibraciona kriva standardnog rastvora askorbinske kiseline



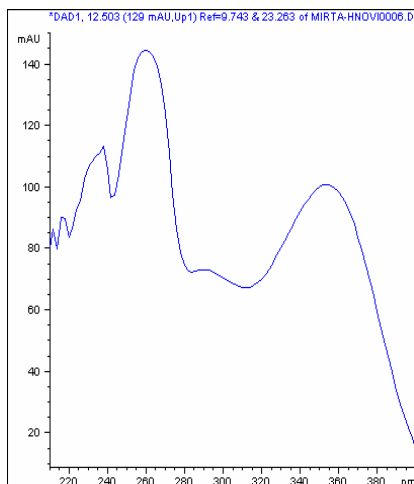
8.3. UV-spektri fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima mirte dobijeni u toku HPLC-DAD analize



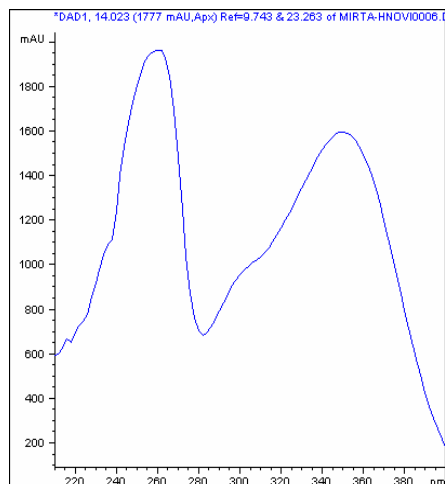
Slika 8.50. UV-spektar komponente Rt 8.69



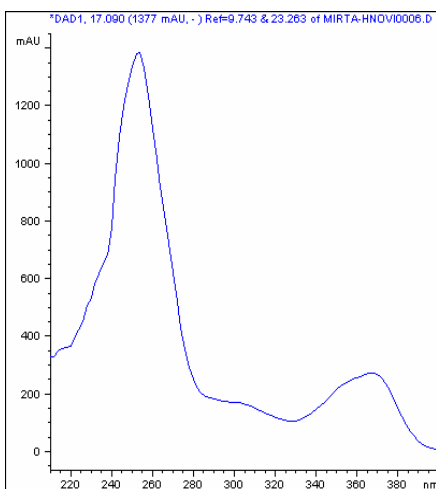
Slika 8.51. UV-spektar komponente Rt 11.27



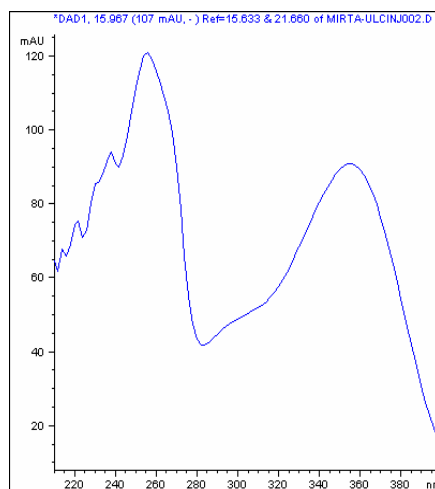
Slika 8.52. UV-spektar komponente Rt 12.50



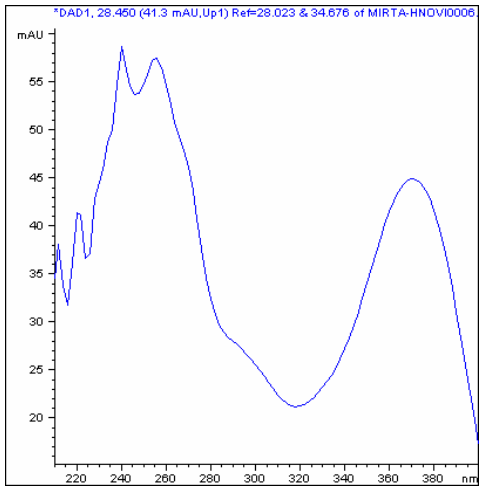
Slika 8.53. UV-spektar komponente Rt 14.02



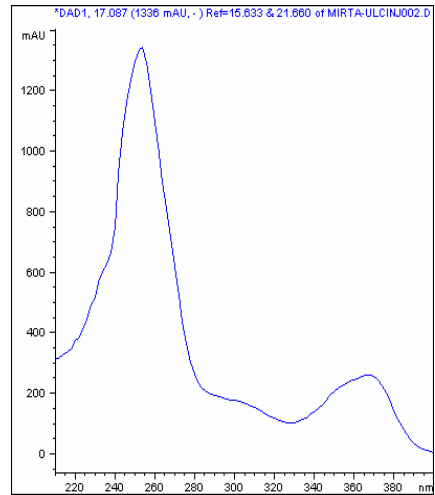
Slika 8.54. UV-spektar komponente Rt 17.09



Slika 8.54. UV-spektar komponente Rt 15.96



Slika 8.55. UV-spektar komponente Rt 28.45



Slika 8.56. UV-spektar komponente Rt 17.08

Skraćenice analitičkih tehnika

GC-MSD – gasna hromatografija sa spektrometrijskom detekcijom masa
HD – hidro destilacija
HPLC-DAD– tečna hromatografija pod visokim pritiskom sa UV detekcijom
NMR – spektrometrija nuklearno magnetne rezonanse
AcOH – sirćetna kiselina
BHA – butilovani hidroksi-anisol
BHT – butilovani hidroksi-toluol

DPPH[•] - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal
EDTA – etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina
EtOAc – etil-acetat

Biohemijske skraćenice

ADP – adenzin-difosfat
ATP – adenzin-trifosfat
Cat - katalaza
CMP – citozin-monofosfat
CoA – koenzim A
cyt - citohrom
DFR – dihidroflavonol-reduktaza
DHHA – dihidroliponska kiselina
DMAPP – dimetilalil-difosfat
DNK – deoksi-ribonukleinska kiselina
EPSP-sintetaza – 3-fosfošikimat-1-karboksivinil-transferaza
FAD – flavin-adenin-dinukleotid
F3'H – flavonoid-3'-hidroksilaza
F3'5'H – flavonoid-3',5'-hidroksilaza
F3βH – flavanon-3-β-hidroksilaza
FLS – flavonol-sintetaza
FMN – flavin-mononukleotid
FPP – farnezil-difosfat
FSI – flavon-sintetaza I
FSII – flavon-sintetaza II
GAP – gliceraldehid-3-fosfat
GGPP – geranil-geranil-difosfat
Glc – glukoza
Glu – glutaminska kiselina
GPP – geranil-difosfat
GPx – glutation-peroksidaza
GR – glutation-reduktaza
GSH – glutation
GSSG – glutation (oksidovani)
3GT – 3-glukozil-transferaza
2-HID – 2-hidroksi-izoflavanon-dehidrataza
2-HIS – 2-hidroksi-izoflavanon-sintetaza

TLC– tankoslojna hromatografija
UV – ultraljubičasti deo spektra
VIS – vidljivi deo spektra

Skraćenice hemikalija i rastvarača

NEDA – N-(1-naftil)-etilendiamin-dihidrochlorid
PG – propil-galat
TBA – 2-tiobarbiturna kiselina
TCA – trihlorsirćetna kiselina

t-BOOH - *terc*-butilhidroperoksid

HMG-CoA – 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA
HSCoA – koenzim A (u slobodnoj formi)
IFS – izoflavon-sintetaza
IPP – izopentenil-difosfat
α-KG - α-keto-glutarna kiselina
α-LA – α-liponska kiselina
LDL – lipoprotein male gustine
LH – lipid
LOOH – lipid-hidroperoksid
LP – lipidna peroksidacija
mtDNK – DNK mitohondrija
MVA – mevalonska kiselina
NAD⁺ – nikotin-adenin-dinukleotid (oksidovani oblik)
NADH – nikotin-adenin-dinukleotid (redukovani oblik)
NADP⁺ – nikotin-adenin-difosfat (oksidovani oblik)
NADPH – nikotin-adenin-difosfat (redukovani oblik)
NRP – ne radikalski proizvod
P_i – neorganski fosfat
PLA – fenilalanin-amino-liaza
PP_i – neorganski difosfat
Px – peroksidaza
RNK – ribonukleinska kiselina
ROS – reaktivne kiseonične vrste
RSC – skevindžer kapacitet
SOD – superoksid-dizmutaza
TAL – tirozin-amino-liaza
TMI – joni prelaznih metala
α-TOH – α-tokoferol
XOD – ksantin-oksidaza

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RRB

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Dušan Bugarin
AU

Mentor: Dr Neda Mimica-Dukić, red. prof. PMF-a
u Novom Sadu

MN

Naslov rada: Antioksidantni, antibakterijski i antimutageni
potencijal vrste
Myrtus communis L. iz Crne Gore

NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geogr. područje: AP Vojvodina
UGP

Godina: 2009.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja: 8. Strana 172 Lit. citata 286.
Tabela 40. Slika 50. Priloga 56.

FO

Naučna oblast: Hemija
NO

Naučna disciplina: Biohemija
ND

Predmetna odrednica/ključne reči: *Myrtus communis* L., etarska ulja, biljni fenoli,
antioksidanti, slobodni radikali, DPPH, OH, NO,

O²⁻, ksantin oksidaza, lipidna peroksidacija, antibakterijsko delovanje, antimutageno delovanje

PO

UDK

Čuva se:

Biblioteka Departmana za hemiju, PMF, Trg
Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

ČU

Važna napomena:

-

VN

Izvod:

Ispitivanja hemijskog sastava etarskih ulja i ekstrakata izvedena su na vrsti *Myrtus communis* L. sa pet lokaliteta iz Crne Gore. Pored toga, ispitana je njihova antioksidantna aktivnost u različitim *in vitro* sistemima kako bi se utvrdio uticaj pomenutih ekstrakata i etarskih ulja na neutralizaciju DPPH, NO, OH i O²⁻ radikala, kao i njihov uticaj na lipidnu peroksidaciju u lipozomima i inhibiciju enzima ksantin-oksidade. Takođe, ispitana je i antibakterijska aktivnost etarskih ulja i ekstrakata ove vrste na 9 bakterijskih sojeva, kao i njihov antimutageni potencijal na bakterijskom soju *Escherichia coli* IC 202.

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 26.02. 2009.

DP

Datum odbrane: 2010.

DO

Članovi komisije:

(naučni stepen/ime i prezime/
zvanje/fakultet)

KO

Predsednik:

Dr Ksenija Kuhajda, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Mentor:

Dr Neda Mimica-Dukić, red. prof. PMF-a u Novom
Sadu

Član:

Dr Boža Pal, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Član:

Dr Branka Vuković-Gačić, red. prof. Biološkog
fakulteta u Beogradu

Član:

Dr Milan Popović, red. prof. Poljoprivrednog fakulteta u
Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOKUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph type
DT

Type of record: Printed text
TR

Contens code: PhD Thesis
CC

Author: Dušan Bugarin
AU

Mentor: Dr Neda Mimica-Dukić, Full Professor,
Faculty of Sciences, University of Novi
Sad

MN

Title: Antioxidant, antimicrobial and
antimutagenic potencial of the *Myrtus
comunis L.*

TI

Language of text: Serbian (latin)
LT

Language of abstract: Serbian/english
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: AP Vojvodina
LP

Publication year: 2009.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publishing place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
PP

Physical description: Chapters: 8. Pages 172 References 286.
Tables 40. Pictures 50. Additional lists
56.

PD

Scientific field: Chemistry
SF

Scientific discipline: Biochemistry
SD

Subject/key word:

Myrtus communis L., essential oils, plant phenolic, antioxidants, free radicals, DPPH, OH, NO, O²⁻, xantin-oxidase, lipid peroxidation, antibacterial activity, antimutagenic activity

UC

Holding data:

Department of Chemistry (library),
Faculty of Sciences, Trg Dositeja
Obradovića 3, Novi Sad

HD

Note: -

N

Abstract:

In this tassis the chemical analysis of the essential oils and methanolic extracts from five plant samples of *Myrtus communis* L., collected from different localities in Montenegro, have been investigate. Beside that, their antioxidant activity in differwnt *in vitro* systems has been study to establish their scavenging potential towards DPPH, NO, OH, and O²⁻ free radicals, as wel as their effects on lipid peroxidation in liposoma and inhibition enzyme XOD. Also, the antibacterial activity of the essential oils and methanolic extract has been study on 9 bacterial strains, as wel as their antimutagenic effects on bacterial strain E. Colli IC202.

AB

Accepted by scientiffic board on:

26.02.2009.

ASB

Deffended:

2010.

DE

Thesis defend board:**(degree/name/surname/title/faculty)**

DB

Chairperson:

Dr Ksenija Kuhajda, Full Professor,
Faculty of Sciences, University of Novi
Sad

Mentor:

Dr Neda Mimica-Dukić, Full Professor,
Faculty of Sciences, University of Novi
Sad

Member:

Dr Boža Pal, Full Professor, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad

Member:

Dr Branka Vuković-Gačić, Full
Professor, Faculty of Biology, University
of Belgrade

Member:

Dr Milan Popović, Full Professor,
Faculty of Agriculture, University of
Novi Sad



Dušan Bugarin je rođen 27. 10. 1978. godine u Bijelom Polju. Osnovnu školu i gimnaziju, opšteg smjera, "Miloje Dobrašinović", završio je u Bijelom Polju. Prirodno-matematički fakultet, odsjek biologija, smjer diplomirani biolog, upisao je 1997. godine u Podgorici. Diplomirao je 2003. godine sa prosječnom ocjenom 8,83. Iste godine upisao je poslediplomske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, smjer hemija, odsjek biohemija, i položio sve ispite predviđene planom i programom sa prosječnom ocejnom 9,14. Od 2005. godine zaposlen je u Srednjoj stručnoj školi u Bijelom Polju na poslovima profesora biologije. U toku svog naučno-istraživačkog rada, objavio je u koautorstvu nekoliko naučnih radova i saopštenja na domaćim i međunarodnim kongresima.

Novi Sad 07.12.2009.

Dušan Bugarin