

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Milan D. Ilić

**UPOREDNA ANALIZA HEMIJSKOG
SASTAVA, ANTIMIKROBNE,
ANTIOKSIDANTNE I CITOTOKSIČNE
AKTIVNOSTI BILJNIH VRSTA RODA
GERANIUM L. IZ JUGOISTOČNE SRBIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Milan D. Ilić

**COMPARATIVE ANALYSIS OF CHEMICAL
COMPOSITION, ANTIMICROBIAL,
ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC
ACTIVITY OF PLANT SPECIES OF THE
GENUS *GERANIUM* L. FROM
SOUTHEASTERN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmakognoziju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta.

Deo eksperimenata urađen je na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju, Katedri za medicinsku biohemiju i Katedri za organsku hemiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, kao i u Institutu za onkologiju Vojvodine.

Mentor

Prof. dr Milica Drobac, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

1. _____

Prof. dr Nada Kovačević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

2. _____

Prof. dr Marina Milenković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

3. _____

Dr sc. Mirjana Marčetić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

4. _____

Prof. dr Bojan Zlatković, redovni profesor
Univerzitet u Nišu - Prirodno matematički fakultet

5. _____

Dr sc. Stevan Samardžić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Datum odbrane _____

Celokupnom kolektivu Katedre za farmakognoziju se najiskrenije zahvaljujem na iskrenoj saradnji tokom prethodnih godina.

Veliku zahvalnost na podršci izražavam svim članovima komisije. Zahvaljujem se prof. dr Nadi Kovačević na prilici da svoj naučnoistraživački rad uradim na Katedri za farmakognoziju. Prof. dr Bojanu Zlatkoviću se zahvaljujem na pomoći u prikupljanju biljnog materijala. Zahvaljujem se dr sc Mirjani Marčetić, vanrednom profesoru, i Stevanu Samardžiću, naučnom saradniku, na pomoći tokom eksperimentalnog rada i tumačenju dobijenih rezultata. Prof. dr Marini Milenković se zahvaljujem na prilici da deo istraživanja uradim na Katedri za mikrobiologiju.

Zahvaljujem se prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević, dr sc Vesni Kojić i dr sc Dimitru Jakimovu na saradnji.

Najveću zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Milici Drobac na neizmernoj pomoći i podršci tokom izrade ove disertacije.

Disertaciju posvećujem porodici i prijateljima.

Uporedna analiza hemijskog sastava, antimikrobne, antioksidantne i citotoksične aktivnosti biljnih vrsta roda *Geranium* L. iz jugoistočne Srbije

Sažetak

U okviru doktorske disertacije izvršena je hemijska karakterizacija i skrining farmakološke aktivnosti podzemnih i nadzemnih delova osam vrsta roda *Geranium* (*G. macrorrhizum*, *G. robertianum*, *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. sanguineum*, *G. columbinum*, *G. pyrenaicum* i *G. lucidum*) poreklom sa Vlasinske visoravni.

Isparljive frakcije izolovane destilacijom vodenom parom analizirane su gasnom hromatografijom sa plameno-jonizacionim i masenim detektorom (GC-FID/MS). Seskviterpeni su bili dominantni u isparljivoj frakciji podzemnog dela *G. macrorrhizum*, kao i u frakcijama nadzemnih delova svih ispitivanih vrsta osim *G. phaeum* i *G. columbinum* gde su preovladali diterpeni. U isparljivim frakcijama podzemnih delova svih ispitivanih vrsta osim *G. macrorrhizum* preovladavale su masne kiseline i njihovi derivati.

Spektrofotometrijskom analizom utvrđeno je da su metanolni ekstrakti bogati polifenolnim jedinjenjima, kao i da su tanini dominantni polifenoli u gotovo svim uzorcima.

Iz metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *G. palustre*, primenom hromatografije u koloni, izolovana su dva jedinjenja koja su na osnovu UV-Vis, MS i NMR spektara identifikovana kao elagni tanin korilagin i flavonoid astragalin-2''-*O*-galat.

Primenom tačne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS) u metanolnim ekstraktima utvrđeno je prisustvo i određen sadržaj ukupno sedam fenolkarboksilnih kiselina (elagne, galne, galoilhina, galoilšikiminske, protokatehinske, hlorogenske i brevifolin karboksilne kiseline), 12 flavonoidnih jedinjenja (kvercetin, kemferola, njihovih heterozida i galoilovanih derivata heterozida, kao i metilovanih derivata kemferola) i 14 taninskih jedinjenja, uključujući elagne tanine (geraniin i njegov izomer, korilagin, telimagrandin I i jedinjenja izomerne strukture, telimagrandin II i hebulaginska kiselina) i galne tanine (galoilglukoza, digaloilglukoza, trigaloilglukoza i pentagaloilglukoza).

Ispitivanjem redukcione sposobnosti u FRAP testu i antiradikalskog delovanja DPPH testom, utvrđeno je da ekstrakti poseduju značajan *in vitro* antioksidantni potencijal, uporediv sa L-askorbinskom kiselinom kao poznatim antioksidansom. Ispitivanjem uticaja na parametre oksidativnog stresa u humanom serumu, utvrđeno je da ekstrakti dovode do značajnog povećanja antioksidantnog kapaciteta humanog seruma, pri čemu je efekat većine ekstrakata bio bolji ili uporediv sa efektom troloksa, kao pozitivne kontrole.

Antimikrobna aktivnost ekstrakata testirana je mikrodilucionom metodom na sedam standardnih sojeva Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, standardnom soju gljivice *Candida albicans*, deset kliničkih izolata *Escherichia coli* i sedam kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae*. Većina ekstrakata ispoljila je aktivnost prema svim standardnim sojevima. Značajna antimikrobna aktivnost prema svim kliničkim izolatima *E. coli* utvrđena je za ekstrakte nadzemnih delova *G. robertianum* i *G. columbinum*, dok je aktivnost prema kliničkim izolatima *K. pneumoniae* bila slabija.

In vitro citotoksična aktivnost ekstrakata, geraniina i elagne kiseline ispitana je MTT testom na ćelijskim linijama humanog karcinoma prostate (PC-3), kolona (HT-29), grlića materice (HeLa) i melanoma (Hs 294T). Selektivnost testa utvrđena je ispitivanjem na zdravim ćelijama – humanim fibroblastima pluća (MRC-5). Svi ekstrakti ispoljili su citotoksično delovanje prema ćelijama karcinoma grlića materice (HeLa), a ekstrakt nadzemnog dela *G. lucidum* i na HT-29 ćelijsku liniju karcinoma kolona. Geraniin je najjaču aktivnost ispoljio

prema HeLa ćelijskoj liniji, uz izraženu selektivnost, dok je citotoksična aktivnost elagne kiseline bila slabija, uz nisku selektivnost.

Ključne reči: vrste roda *Geranium*, isparljive frakcije, flavonoidi, fenolkarboksilne kiseline, elagni tanini, GC-FID/MS, LC-MS, antimikrobna aktivnost, antioksidantna aktivnost, citotoksična aktivnost.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakognozija

Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of plant species of the genus *Geranium* L. from southeastern Serbia

Abstract

The subject of this doctoral dissertation was the chemical characterization and screening of the pharmacological activity of the underground and aerial parts of eight species of the genus *Geranium* (*G. macrorrhizum*, *G. robertianum*, *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. sanguineum*, *G. columbinum*, *G. pyrenaicum* and *G. lucidum*), originating from the Vlasina Plateau.

The volatile fractions isolated by hydrodistillation were analyzed by gas chromatography with flame ionization detector and mass detector (GC-FID/MS). Sesquiterpenes dominated in the volatile fraction of the underground parts of *G. macrorrhizum* as well as in the fractions of the aerial parts of all species studied except *G. phaeum* and *G. columbinum*, where diterpenes predominated. Fatty acids and their derivatives predominated in the volatile fractions of the underground parts of all examined species except *G. macrorrhizum*.

Spectrophotometric analysis showed that the methanolic extracts were rich in polyphenolic compounds and that tannins were the dominant polyphenols in almost all samples.

Two compounds were isolated from the methanolic extract of the aerial parts of *G. palustre* by column chromatography and identified as the ellagitannin corilagin and the flavonoid astragalin-2"-O-gallate by UV-Vis, MS - and NMR spectra.

In the methanolic extracts, liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS) was used for identification and quantification of seven phenolic acids (ellagic, gallic, galloylquinic, galloylshikimic, protocatechuic, chlorogenic and brevifolincarboxylic acid), 12 flavonoid compounds (quercetin, kaempferol, their heterosides, galloylated derivatives of heterosides and methylated derivatives of kaempferol) and 14 tannin compounds, including ellagitannins (geraniin and its isomer, corilagin, telimagrandin I and isomeric compounds, telimagrandin II, and chebulagic acid) and gallotannins (galloylglucose, digalloylglucose, trigalloylglucose, and pentagalloylglucose).

By studying the reducing power in the FRAP assay and the antiradical activity in the DPPH assay, the extracts were found to have significant antioxidant potential *in vitro*, comparable to L-ascorbic acid as a known antioxidant. When the effect on human serum oxidative stress parameters was examined, it was found that the extracts led to a significant increase in the antioxidant capacity of human serum, and the effect of most of the extracts was better than or comparable to the effect of Trolox as a positive control.

The antimicrobial activity of the extracts was tested by the microdilution method on seven standard strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria, one standard strain of the yeast *Candida albicans*, ten clinical isolates of *Escherichia coli*, and seven clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Most of the extracts showed activity against all standard strains. Significant activity against all clinical isolates of *E. coli* was observed for the extracts of the aerial parts of *G. robertianum* and *G. columbinum*, while activity against clinical isolates of *K. pneumoniae* was weaker.

The *in vitro* cytotoxic activity of the extracts, geraniin and ellagic acid was tested by MTT assay on human prostate (PC-3), colon (HT-29), cervical (HeLa) and melanoma (Hs 294T) cell lines. The selectivity of the assay was determined by testing on healthy cells - human lung fibroblasts (MRC-5). All extracts showed cytotoxic activity against cervical cancer cells (HeLa) and the extract from the aerial parts of *G. lucidum* also against the HT-29 colon cancer cell line.

Geraniin showed the strongest activity against the HeLa cell line, with pronounced selectivity, whereas the cytotoxic activity of ellagic acid was weaker and with lower selectivity.

Keywords: *Geranium* species, volatile fractions, flavonoids, phenolic acids, ellagitannins, GC-FID/MS, LC-MS, antimicrobial activity, antioxidant activity, cytotoxic activity.

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmacognosy

SADRŽAJ

UVOD	1
1. Familija Geraniaceae Juss.	1
2. Rod <i>Geranium</i> L.....	2
3. Ispitivane vrste roda <i>Geranium</i>	2
3.1. <i>Geranium macrorrhizum</i> L.	2
3.2. <i>Geranium robertianum</i> L.	3
3.3. <i>Geranium phaeum</i> L.....	4
3.4. <i>Geranium palustre</i> Torn.....	5
3.5. <i>Geranium sanguineum</i> L.....	6
3.6. <i>Geranium columbinum</i> L.....	6
3.7. <i>Geranium pyrenaicum</i> Burm.....	7
3.8. <i>Geranium lucidum</i> L.	8
4. Sekundarni metaboliti biljaka roda <i>Geranium</i>	9
4.1. Biosinteza sekundarnih metabolita biljaka roda <i>Geranium</i>	20
5. Etnomedicinska primena biljaka roda <i>Geranium</i>	25
6. Farmakološka aktivnost biljaka roda <i>Geranium</i>	27
6.1. Antioksidantna aktivnost	27
6.2. Antimikrobna aktivnost	28
6.3. Citotoksična aktivnost	29
6.4. Antiinflamatorna aktivnost.....	30
6.5. Ostale farmakološke aktivnosti	31
CILJ	32
MATERIJAL I METODE	33
1. Biljni materijal.....	33
2. Izolovanje i analiza hemijskog sastava isparljivih frakcija	34
2.1. Izolovanje isparljivih frakcija.....	34
2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza isparljivih frakcija	34
3. Priprema metanolnih ekstrakata	35
4. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina u metanolnim ekstraktima	35
5. Izolovanje i utvrđivanje strukture sekundarnih metabolita iz metanolnog ekstrakta nadzemnog dela <i>G. palustre</i>	36
5.1. Izolovanje sekundarnih metabolita.....	36
5.2. Utvrđivanje strukture izolovanih sekundarnih metabolita	37
6. Analiza hemijskog sastava metanolnih ekstrakata	38

7.	Ispitivanje antioksidantne aktivnosti metanolnih ekstrakata.....	40
7.1.	Ukupna antioksidantna aktivnost (FRAP test)	40
7.2.	Test neutralizacije DPPH radikala	41
7.3.	Određivanje parametara oksidativnog stresa u humanom serumu	41
7.4.	Statistička obrada podataka	45
8.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata.....	46
8.1.	Testirani mikroorganizmi	46
8.2.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije	47
9.	Ispitivanje citotoksične aktivnosti metanolnih ekstrakata.....	47
9.1.	Ćelijske linije.....	48
9.2.	Određivanje broja ćelija i vijabilnosti	48
9.3.	Tretman ćelijskih linija.....	49
9.4.	Određivanje ćelijskog preživljavanja MTT testom	49
	REZULTATI I DISKUSIJA	50
1.	Hemijski sastav isparljivih frakcija	50
2.	Hemijska analiza metanolnih ekstrakata	61
2.1.	Sadržaj ukupnih polifenola i tanina.....	61
2.2.	Rezultati utvrđivanja hemijske strukture sekundarnih metabolita izolovanih iz metanolnog ekstrakta nadzemnog dela <i>G. palustre</i>	62
2.3.	Hemijski sastav metanolnih ekstrakata	70
3.	Farmakološka aktivnost metanolnih ekstrakata	82
3.1.	Antioksidantna aktivnost	82
3.1.1.	FRAP test.....	82
3.1.2.	DPPH test	83
3.1.3.	Uticaj na parametre oksidativnog stresa.....	84
3.2.	Antimikrobna aktivnost.....	88
3.3.	Citotoksična aktivnost	94
	ZAKLJUČCI	98
	LITERATURA	103

UVOD

Priroda je neiscrpan izvor biološki aktivnih jedinjenja sa potencijalnom terapijskom primenom. Postoje podaci da je više od polovine postojećih terapeutika prirodnog porekla ili da su nastali modifikacijom jedinjenja prirodnog porekla, a što je posebno izraženo kod antiinfektivnih lekova i antineoplastika (Newman i Cragg, 2016; Khazir i sar., 2013). U tom kontekstu ispitivanje sastojaka biljnih vrsta koje do sada nisu proučavane ima značaj, jer pruža potencijalnu mogućnost pronalazjenja novih lekovitih biljnih sirovina i farmakološki aktivnih molekula. Pored toga, jedan od mogućih pristupa naučnom istraživanju u oblasti farmakognozijske uključuje primenu savremenih analitičkih tehnika u cilju hemijske analize biljnih vrsta koje se koriste u tradicionalnoj medicini i potpuno određivanje hemijske strukture sastojaka ovih biljaka, zatim povezivanje hemijskih struktura sa određenim farmakološkim efektima i terapijskim mogućnostima, kao i potvrdu njihove terapijske efikasnosti.

Poslednjih decenija rezistencija na antibiotike predstavlja globalnu pretnju. Prema procenama, do 2050. godine broj smrtnih slučajeva usled rezistencije na antibiotike biće 10 miliona godišnje (O'Neill, 2014). Sa druge strane, karcinom je drugi glavni uzrok smrti, nakon ishemijskih bolesti srca, a smatra se da će do 2060. godine verovatno biti na prvom mestu (Mattiuzzi i Lippi, 2019). U skladu sa tim, sve je veći broj istraživanja usmerenih ka otkrivanju novih potencijalnih antimikrobnih i antitumorskih što je i jedan od ciljeva ovog istraživanja.

Biljke roda *Geranium* (fam. Geraniaceae) imaju značajnu primenu i veoma su cenjene u tradicionalnoj medicini Balkanskog poluostrva (Tucakov, 1997; Menković i sar., 2014; Menković i sar., 2011; Živković i sar., 2020; Papović i sar., 2021; Savić i sar., 2019; Matejić i sar., 2020; Živković i sar., 2021, Ivancheva i Stantcheva, 2000). S obzirom na to da pojedine vrste ovog roda nisu ispitivane ili su delimično ispitane u pogledu hemijskog sastava i/ili farmakološke aktivnosti, poslednjih godina postoji interes za njihovo proučavanje.

1. Familija Geraniaceae Juss.

Familija Geraniaceae Juss. broji oko 830 vrsta raspoređenih u sedam rodova (Xu i Deng, 2017). Predstavlja kosmopolitsku familiju, rasprostranjenu od hladnih do tropskih područja. Biljke ove familije su široko rasprostranjene u Evropi, Aziji, severnoj, istočnoj i južnoj Africi, većem delu Severne Amerike, krajnjem zapadu i jugu Južne Amerike i krajnjem jugu Australije (Nikolić, 2013).

U flori Evrope zastupljena su tri roda ova familije: *Geranium* L. sa 39 vrsta, *Erodium* L'Her. sa 34 vrste i *Biebersteinia* Stephan sa jednom vrstom, dok se u flori Srbije navode dva roda ove familije: *Geranium* L. sa 23 vrste i *Erodium* L'Her. sa dve vrste (Janković, 1973; Webb, 1968).

Biljke familije Geraniaceae su uglavnom višegodišnje, ređe jednogodišnje, zeljaste, a vrlo retko polužbunovi, sa šapastim ili režnjevito usečenim listovima i nežlezdanim ili žlezdanim dlakama. Cvetovi su hermafroditni, aktinomorfni, pojedinačni ili po par na cvetnoj stabljici, crvene ili plavičaste boje. Čašičnih i kruničnih listića ima po pet (retko po četiri), prašnika je deset, od kojih je pet spoljašnjih često bez prašnica (sterilni). Plodnik je nadcvetan sa pet plodnih listića koji su kružno raspoređeni oko osovine i sadrže jedan do dva semena zametka. Plod je šizokarpijum koji se raspada na pet jedno semenih plodića (karpidija) od kojih svaki ima dugačak kljun koji se zrenjem odvajaju od osovine i uvija lučno ili spiralno (Janković, 1973).

2. Rod *Geranium* L.

Rod *Geranium* L. obuhvata preko 350 vrsta (Aedo i Pando, 2017). To su jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, retko polužbunovi ili žbunovi koji naseljavaju umerenu zonu pretežno severne hemisfere, dok su u tropskim oblastima zastupljene samo u planinskim područjima. Uglavnom su visine 0,5 do 4 m sa naspramnim ili ređe naizmeničnim, dlanasto okruglastim ili režnjevito usečenim listovima. Donji listovi su sa zaliscima i obrazuju rozetu. Izdanak je većinom dlakav od nežlezdanih ili žlezdanih dlaka, retko go. Cvetne drške su pazušne, sa po dva cveta, retko jednocvetne. Cvetovi su aktinomorfni sa po pet čašičnih i kruničnih listića. Nektarija ima takođe pet, a prašnika deset. Prašnici su slobodni ili pri osnovi donekle srasli, duži sa spoljne strane; svi prašnici su fertilni. Gineceum je od pet oplodnih listića (karpela). Karpele su na vrhu izvučene u kljunast izraštaj i svi zajedno formiraju stubić na čijem vrhu je pet žigova. Semenih zametaka ima po dva u svakom okcu. Plod je jednosemen. Karpidije su sa leđne strane zaokrugljene, sa kljunom koji je sa unutrašnje strane gladak, a pri zrenju lučno savijen (Janković, 1973).

U flori Srbije zastupljene su 23 vrste ovog roda: *G. macrorrhizum* L., *G. robertianum* L., *G. phaeum* L., *G. palustre* Torn., *G. sanguineum* L., *G. pyrenaicum* Burm., *G. columbinum* L., *G. lucidum* L., *G. villosum* Ten., *G. molle* L., *G. divaricatum* Ehrh., *G. bohemicum* Torn., *G. pusillum* Burm., *G. dissectum* Jusl., *G. striatum* Jusl., *G. sylvaticum* L., *G. asphodeloides* Burm., *G. nodosum* L., *G. purpureum* Vill., *G. reflexum* L., *G. subcaulescens* L'Her., *G. rotundifolium* L. i *G. coeruleatum* Schur (Janković, 1973; Diklić, 1977).

Veći broj vrsta ovog ovog roda zastupljen je u flori Vlasinske visoravni koja se svrstava u potencijalne centre biljnog diverziteta Srbije (Stevanović i sar., 1995; Ranđelović i Zlatković, 2010).

3. Ispitivane vrste roda *Geranium*

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je osam vrsta roda *Geranium* raspoređenih na osnovu osobina ploda u šest sekcija prema klasifikaciji Yeo (1984): *G. macrorrhizum* (sect. *Unguiculata*), *G. robertianum* (sect. *Robertium*), *G. phaeum* (sect. *Erodioideae*), *G. palustre*, *G. sanguineum* i *G. columbinum* (sect. *Geranium*), *G. pyrenaicum* (sect. *Batrachioides*) i *G. lucidum* (sect. *Lucida*), poreklom sa Vlasinske visoravni.

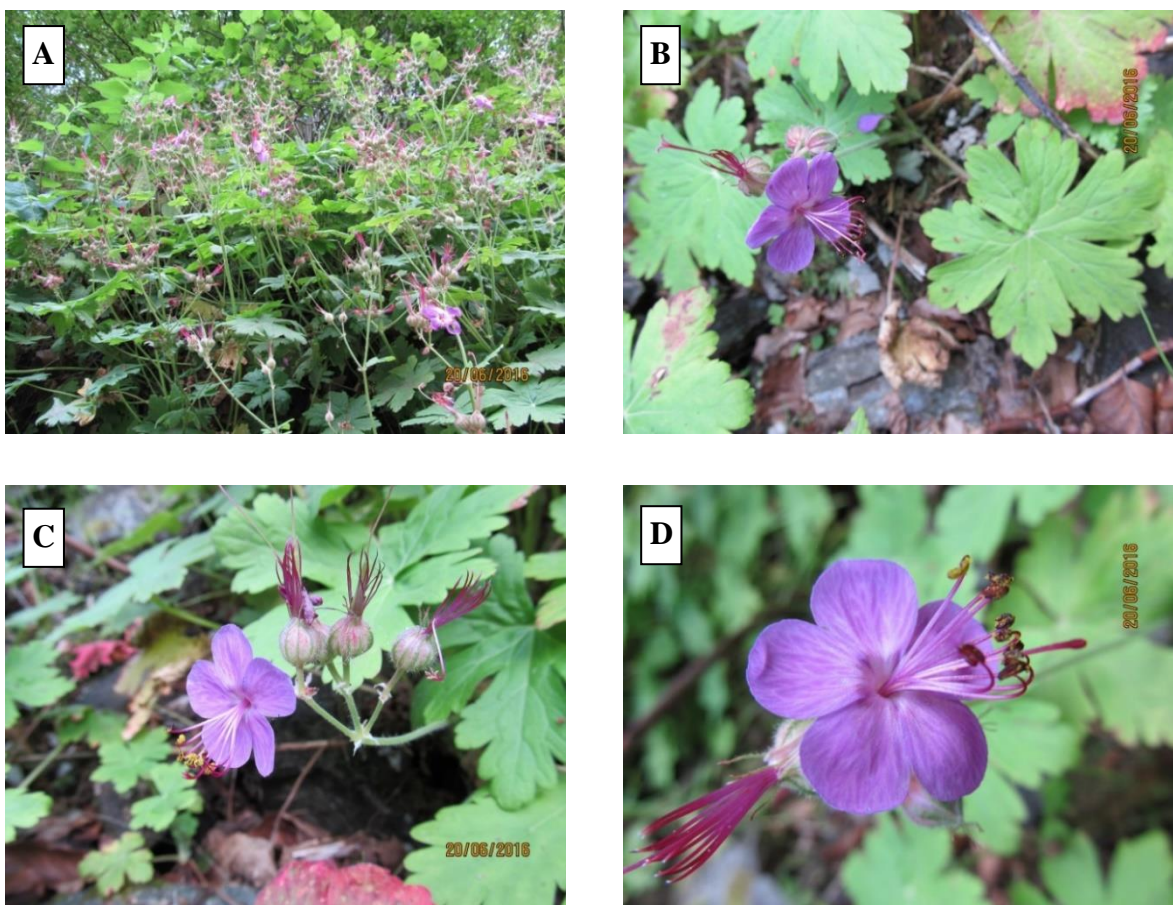
3.1. *Geranium macrorrhizum* L.

Geranium macrorrhizum (Slika 1) je višegodišnja, zeljasta ili čak polužbunasta biljka sa horizontalnim, debelim rizomom, gusto pokrivenim ljuspastim zaliscima. Čitava biljka je dlakava, karakterističnog prijatnog mirisa. Stabljike su uspravne sa velikim brojem listova u rozeti. Donji, rozetni listovi su na brazdastim, tankim peteljkaama. Liska je okrugla, sa mrežastom nervaturom, duboko podeljena na sedam režnjeva (Slika 1B). Cvetovi su upadljivi sa čašičnim listićima jajastog i kruničnim listićima objajastog oblika, tamnocrvene ili ljubičaste boje (Slike 1C i 1D). Plod je žutomrk, karpidije su duge, poprečno naborane i ponekad gole, a seme je glatko (Janković, 1973).

Raste u svetlim listopadnim šumama, na vlažnim mestima, kao i na krečnjačkim terenima brdskih i planinskih krajeva (Tasić i sar., 2009).

Rasprostranjena je u južnoj i srednjoj Evropi, a u Srbiji je zastupljena u brdskim predelima. Takođe se gaji i kao baštenska biljka (Janković, 1973).

Ova vrsta je u narodu poznata kao zdravac.



Slika 1. *Geranium macrorrhizum*: A - habitus, B - list, C i D – cvet

3.2. *Geranium robertianum* L.

Geranium robertianum je jednogodišnja zeljasta biljka sa slabim, ali razgranatim korenom. Stabljika je uspravna ili uzlazeća, dugačka 15-40 (70) cm, razgranata, sočna, lako lomljiva i prekrivena dugim štrčećim dlakama. Listovi su trouglasti, podeljeni na tri do pet perasto deljenih režnjeva od kojih je vršni režanj na peteljci, a bočni skoro sedeći (Slika 2A). Listovi su sa obe strane prekriveni dlakama. Cvetovi su na dugačkim drškama, petočlani. Krunični listići su objajasti, svetlocrvene do ljubičaste boje, dvostruko duži od čašičnih (Slika 2B). Plod je šizokarpijum. Cela biljka je obrasla žlezdanim dlakama, jakog i specifičnog mirisa. Cveti od maja do avgusta, a plodonosi od juna do oktobra (Janković, 1973; Tasić i sar., 2009).

Naseljava tamne listopadne, četinarske i mešovite šume, stene u senovitim i vlažnim mestima u planinskoj i subalpskoj zoni sve do 1800 m nadmorske visine.

Rasprostranjena je u gotovo čitavoj Evropi, osim krajnjeg severa, u Africi južno od Ugande, istočno od Kanarskih ostrva, Severnoj i Južnoj Americi (Janković, 1973).

Narodni naziv za ovu vrstu je živa trava ili pastirska iglica.



Slika 2. *Geranium robertianum*: A - list, B - cvet

3.3. *Geranium phaeum* L.

Geranium phaeum (Slika 3) je višegodišnja, zeljasta biljka sa rizomom usađenim vertikalno u zemlju, debljine oko 1 cm. Stabljika je jednostavna, ka vrhu razgranata, visine 30-70 cm, pokrivena razbacanim, dugim i odstojećim dlakama, a pri vrhu i žlezdanim dlakama. Prizemni listovi u rozeti, kao i listovi u donjem delu stabljike su na golim peteljka dugim 10-30 cm, često upola osušeni. Liska je bubrežasto-okruglog oblika, široka 5-10 cm, urezana na 5-7 režnjeva, široko klinasto-rombičnih i u gornjem delu krupno nazubljenih. Nervatura je mrežasta, na licu pokrivena dugim priljubljenim dlakama, a na naličju gola ili samo u uglovima nerava maljava od kratkih dlaka.



Slika 3. *Geranium phaeum*: A i B - habitus, C i D - cvet

Listovi na stablu su naizmenično raspoređeni, manji i na kraćim drškama, većinom samo donji podeljeni na tri do pet režnjeva. Gornji listovi su sedeći, manje izdeljeni. Zalisci su jajasto-lancetastog oblika, zaoštreni, dlakavi i mrki. Čašični listići su izduženo jajastog ili eliptičnog oblika, dugi 6-7 mm, sa kratkim zaoštrenim vrhom i 3 nejasna nerva. Po obodu i na osnovi su prekriveni dugim dlakama. Krunica je okrugla, svetlo do tamnoljubičasta ili ljubičasto mrka (Slike 3C i 3D). Krunični listići su objajastog oblika, po obodu talasasti. Plod je dugačak 2-2,5 cm, a semena su glatka, svetlornke boje. Cveta i plodonosi od maja do avgusta, a na većim visinama od jula do oktobra (Janković, 1973).

Naseljava svetle, širokolisne šume i žbunaste zajednice, šumske obode i proplanke, mezofilne livade, uglavnom brdskog i subalpskog pojasa.

Rasprostranjena je isključivo u Evropi i to pre svega u južnom i srednjem delu (Janković, 1973).

U narodu je *G. phaeum* poznat kao vilino oko ili zdravinjak.

3.4. *Geranium palustre* Torn.

Geranium palustre (Slika 4) je višegodišnja, zeljasta biljka sa koso položenim rizomom pokrivenim ostacima zalistaka, sa 1-3 stabljike i malobrojnim listovima koji rano odumiru. Stabljika je visoka 30-40 cm, slaba, sa dugačkim internodijama i izrazito zadebljalim nodusima, višestruko razgranata, prekrivena velikim brojem nežlezdanih dlaka. Donji listovi su sa dlakavim, dugačkim peteljka, širokom liskom, podeljenom na 7 deltoidnih režnjeva, dlakavi sa obe strane. Listovi na stablu su petodelni. Gornji listovi su skoro sedeći, često trodelni. Zalisci su jajasto-lancetastog oblika, crvenornke boje, goli. Cvetovi su krupni, sa jajastim, dlakavim i po obodu beličastim ili crvenkastim čašičnim listićima. Krunični listići su rozeljubičaste boje, duži od čašičnih, u donjem delu dlakavi (Slika 4C).



Slika 4. *Geranium palustre*: A i B - habitus, C - cvet

Karpidije ploda su mestimično dlakave, kao i seme. Cveta u junu i julu, plodonosi u avgustu i septembru (Janković, 1973).

Naseljava vlažna mesta kao što su vlažne livade i doline, šumske obode, svetle, vlažne do umereno suve listopadne šume, močvarne livade, žbunjake, planinske livade, uglavnom u nizijama i brdskom pojasu, ali i na nadmorskim visinama do 1400 m.

Rasprostranjena je u zapadnoj, srednjoj i istočnoj Evropi, zapadnom Sibiru i Kavkazu (Janković, 1973).

3.5. *Geranium sanguineum* L.

Geranium sanguineum (Slika 5) je višegodišnja, zeljasta biljka sa jakim, horizontalnim, čvornovitim rizomom, debljine 5-8 mm i stabljikom visine 20-50 cm, koja je često od osnove slabo razgranata ili jednostavna, pokrivena dugim dlakama. Stabljika pri osnovi i donji listovi često krajem vegetacione sezone dobijaju intenzivnu crvenu boju. Listovi su sa dugim peteljka, liska je podeljena na pet do sedam režnjeva koji su opet podeljeni na pet do sedam uzanih režnjića, zaoštrenih i prekrivenih dlakama koje su na naličju lista bele. Zalisci su jajasti do lancetasti, crvenomrke boje. Cvetne drške su dugačke 2 do 10 cm, uglavnom sa jednim cvetom (retko dva) sa po dve jajaste brakteje. Čašični listići su široko eliptični sa špicastim vrhom i dugačkim dlakama. Krunični listići su crvene do ljubičaste boje, objajasti, dužine 13-20 mm i klinasto suženi. Karpidije su 4-5 mm duge, dlakave, semena glatka ili fino tačkasta. Cveta od maja do jula, a plodonosi od jula do septembra.

Naseljava suve livade, kamenita mesta naročito na južnim padinama, svetle i suve listopadne i borove šume, krečnjačke terene u severnim delovima aerala do 1000 m nadmorske visine, ali ponekad i znatno više (Janković, 1973).

Rasprostranjena u najvećem delu Evrope, severno do Irske, Engleske i južne Skandinavije, istočno do moskovskog područja, Kavkaza i Jermenije, južno do Krima, Grčke, Italije, Francuske, Španije i Portugalije (Janković, 1973).

Geranium sanguineum je u narodu poznat kao devojačko oko.



Slika 5. *Geranium sanguineum*

3.6. *Geranium columbinum* L.

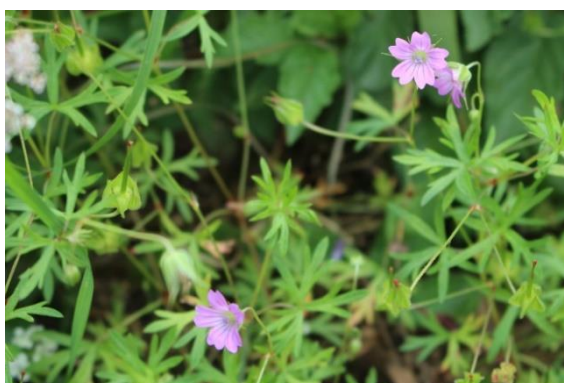
Geranium columbinum (Slika 6) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka sa mnogobrojnim razgranatim stabljikama, visine 10-60 cm, pokrivenim dlakama. Donji listovi u rozeti su na dugim drškama (10-20 cm), u konturi okruglo petougaoni, skoro do osnove duboko

usečeni na pet do sedam jednostavnih ili duplo perasto deljenih linearnih režnjeva. Gornji listovi na stablu podeljeni su na tri do pet još užih režnjeva. Liske na naličju duž nerava i po obodu su obrasle oštrim dlakama. Zalisci su lancetasti, često crveni. Zajedničke cvetne drške su dugačke, sa linearnim braktejama i sa po dve cvetne peteljke. Čašični listići su jajasti do lancetasti, bez dlaka. Krunični listići su objajasto srcasti, ljubičasto ili bledo crveni. Karpidije su gole, a seme fino mrežasto tačkasto. Cveti i plodonosi tokom maja i juna (Janković, 1973).

Naseljava zatravljena mesta, njive, sušne livade, šumske proplanke, žbunjake, toplo i mineralno zemljište u brdskom i planinskom pojasu sve do 1500 m nadmorske visine.

Ova vrsta je rasprostranjena u većem delu Evrope i Azije, prevashodno u Sredozemlju, na Balkanskom poluostrvu, istočnom i srednjem Sibiru, Kavkazu i Iranu (Janković, 1973).

Geranium columbinum je u narodu poznat kao golubija noga ili krvavac.



Slika 6. *Geranium columbinum*

3.7. *Geranium pyrenaicum* Burm.

Geranium pyrenaicum (Slika 7) je dvogodišnja do višegodišnja zeljasta biljka sa kratkim, vertikalnim i višeglavim rizomom sa ostacima zalistaka i lisnih peteljki. Stabljika je uglavnom nekoliko (dve do pet), uspravnih ili ustajućih, ka vrhu razgranatih, dužine 20-80 cm, pokrivenih kratkim dlakama, kao i dugačkim mekim dlakama, ka vrhu često žlezdanim. Listovi u rozeti su mnogobrojni, na peteljkama dugačkim 5-20 cm. Liska je širine 3-5 cm, bubrežasto okrugla, većinom do polovine ili još dublje usečena na sedam do devet širokih klinastih ili objajastih režnjeva koji su obično široki koliko i dugački, na vrhu većinom zatupasti i urezani na pet do devet zubaca.



Slika 7. *Geranium pyrenaicum*

Listovi na stabljici su naspramno raspoređeni, na kratkim drškama, dok su gornji listovi sitni i sedeći. List je sa obe strane dlakav, a zalisci su jajasto-lancetasti, suvi, kožasti. Cvetne drške su u pazuhu lista, tanke, duže od svojih listova, sa žlezdanim dlakama. Cvetne peteljke posle cvetanja su oborene sa plodovima uspravljenim uvis. Cvetovi su dugački 7-10 mm. Čašični listići su jajasto-elipičnog oblika, zatupasti, sa nejasnom nervaturom, gusto dlakavi od kratkih žlezdanih dlaka i mnogobrojnih kratkih nežlezdanih dlaka. Krunični listići su približno dva puta duži od čašičnih (7-11 mm), obrnuto srcastog oblika, duboko i usko usečeni, svetloljubičaste boje (Slika 6B). Plod je sa vrlo kratkim ostatkom stubića. Karpidije su gole ili pokrivene jednostavnim prileglim dlakama. Semena su potpuno glatka, crvenomrke boje. Cveta od maja do septembra, a plodonosi od juna do novembra (Janković, 1973).

Raste na senovitim mestima, u žbunjacima, na pašnjacima i oranicama, u vrtovima, na zaštićenim mestima, u subalpskom i alpskom pojasu, najčešće do 1000 m, ali i preko 2000 m nadmorske visine.

Iako se prvobitno smatralo da je rasprostranjena samo u mediteranskom području i u Italiji, kao i od Atlasa do Kavkaza i Libana, ova vrsta je zastupljena u većem delu Evrope, severno sve do Irske, jugozapadne Engleske, Danske, južnih delova Skandinavije i u srednjoj Rusiji (Janković, 1973).

Narodni naziv za ovu vrstu je carevo oko.

3.8. *Geranium lucidum* L.

Geranium lucidum (Slika 8) je jednogodišnja biljka, sa slabo razgranatim korenom. Cela biljka je gola i sjajna. Stabljika je visine 10-40 cm, gola, pri osnovi mrka, kasnije postaje crvenkasta. Donji listovi su u rozeti, na dugačkim peteljkama i rano odumiru. Listovi na stabljici su sa kraćim i naspramnim peteljkama koje su u donjem delu dlakave. Lisna ploča je okruglo bubrežasta, duboko urezana na 5 objajastih širokih režnjeva koji su u gornjem delu zaokrugljeni i plitko nazubljeni, sjajna, a kasnije postaje crvenkasta. Cvetovi su sitni, sa jajasto lancetastim čašičnim listićima koji su obodom opnasti, na leđnoj strani hrapavi i sa pukotinama i naborima sa obe strane nerava. Krunični listići su svetlocrvene boje, objajasto izduženi, na vrhu zaobljeni. Karpidije ploda su mrežasto naborane sa leđne strane, a seme je glatko. Cveta aprila i maja, plodonosi od maja do avgusta (Janković, 1973).

Naseljava senovita i vlažna, ali topla mesta, stene, senovite sume i žbunjake, uglavnom u brdskim i planinskim predelima, a južnije i u subalpskom pojasu.

Rasprostranjena u zapadnoj, srednjoj, istočnoj i jugoistočnoj Evropi, zapadnom i istočnom Mediteranu i Maloj Aziji (Janković, 1973).

Narodni naziv za *G. lucidum* je ilja crvena.



Slika 8. *Geranium lucidum*

4. Sekundarni metaboliti biljaka roda *Geranium*

Vrste roda *Geranium* su bogate polifenolnim jedinjenjima. Dominantna grupa polifenolnih sekundarnih metabolita su tanini među kojima su najzastupljeniji elagni tanini kao podgrupa hidrolizujućih tanina. Elagni tanin geraniin, karakterističan je za biljke roda *Geranium*. Pored tanina, značajni fenolni sastojci u *Geranium* vrstama su flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline (Harborne i Williams, 2002). Fenolna jedinjenja identifikovana u vrstama ovog roda koje su predmet istraživanja doktorske disertacije data su u Tabeli 1.

Vrste ovog roda sadrže i male količine etarskog ulja (Harborne i Williams, 2002). Dosadašnja ispitivanja hemijskog sastava isparljivih frakcija/etarskih ulja uglavnom su bila usmerena na analizu nadzemnih delova, dok su isparljivi sastojci podzemnih organa ređe bili predmet proučavanja.

Tanini

Tanini predstavljaju dominantnu grupa polifenolnih jedinjenja prisutnih u biljkama familije Geraniaceae, odnosno roda *Geranium* (Bate-Smith, 1972).

Haslam i Cai (1994) su klasifikovali ova polifenolna jedinjenja u dve grupe: (i) estri galne i heksahidroksidifenske kiseline i njihovi derivati i (ii) kondenzovani proantocijanidini. Prva grupa je dalje podeljena na (1) jednostavne estre, (2) depside, (3) estre heksahidroksidifenske i dehidroheksahidroksidifenske kiseline i (4) dimere i više oligomere koji nastaju oksidativnim kuplovanjem monomera (pre svega jedinjenja iz podgrupe 3).

Tanini se generalno dele na hidrolizujuće, koji podležu hidrolizi pod uticajem enzima tanaza ili zagrevanjem u vodi i kondenzovane, koji ne podležu hidrolizi (Gross, 1999). Hidrolizujući mogu biti galni uključujući *meta*-depside i elagni. Ipak, usled velikog broja novoidentifikovanih jedinjenja, Okuda i saradnici (2000) su predložili novu klasifikaciju hidrolizujućih tanina na osnovu načina njihove razgradnje i stepena oksidacije estarskih galoil grupa. Po ovoj klasifikaciji, I grupu čine galni tanini i predstavljaju estre galne kiseline i poliola (uglavnom D-glukoze, ali i ksiloze, fruktoze, saharoze i dr.). Elagni tanini koji u svom sastavu imaju heksahidroksidifensku kiselinu (HHDP) čine grupu II, dok oni sa dehidroheksahidroksidifenskom kiselinom (DHHDP) čine grupu III. Grupu IV čine elagni tanini koji su podlegli dodatnim hemijskim transformacijama. Međutim, i pored ove klasifikacije, potrebno je uzeti u obzir i druge monomerne elagne tanine koji nastaju hemijskim transformacijama koje uključuju otvaranje D-glukopiranoznog jezgra, formiranje C-aril glukozidnih veza i reakcije kondenzacije na C1 položaju glukoze. Ovako nastali elagni tanini poseduju strukturne karakteristike slične onima iz grupa II-IV i u skladu sa tim se klasifikuju kao tip II-IV+.

Kondenzovani tanini su oligomerni i polimerni proantocijanidini nastali povezivanjem jednog molekula katehina na položaju C-4 sa molekulom sledećeg katehina na položaju C-8 ili C-6.

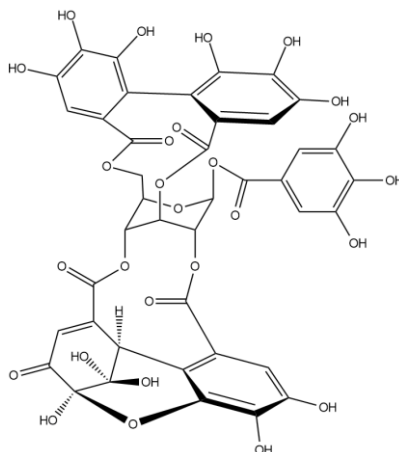
Treba pomenuti i kompleksne tanine koji se sastoje od gradivnih jedinica katehina i galnih ili elagnih tanina (Khanbabae i Van Ree, 2001).

Vrste roda *Geranium* se karakterišu, pre svega, prisustvom elagnih tanina. Njihov sadržaj u biljkama ovog roda je različit i prema literaturnim podacima u listovima *G. sanguineum* iznosi 20%, *G. sylvaticum* 13%, dok je nešto niži u listovima *G. lucidum* (4-5%), *G. nodosum* (3-7%), *G. robertianum* (5%) i *G. phaeum* (2%) (sadržaj je izražen preko heksahidroksidifenilglukoze, HHDPG) (Bate-Smith, 1972).

Geraniin, elagni tanin prvi put izolovan iz vrste *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc. je karakteristično jedinjenja za vrste familije Geraniaceae. Pripada trećoj grupi tanina prema prethodno navedenoj klasifikaciji i sastoji se od centralnog molekula glukoze supstituisanog sa

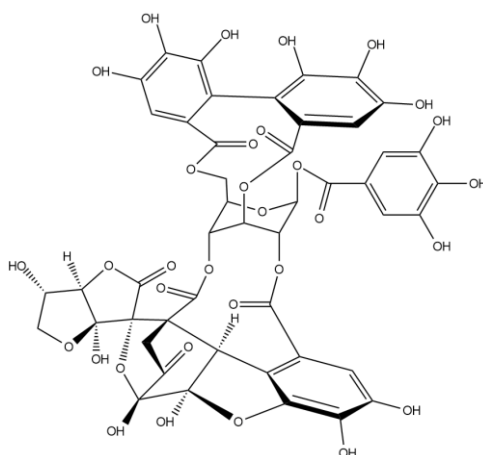
po jednim molekulom heksahidroksidifenske, dehidroheksahidroksidifenske i galne kiseline (Slika 9) (Okuda, 1976). Najzastupljeniji je u listovima, u stabljikama je prisutan u znatno manjoj koncentraciji, a takođe je detektovan i u tučku i čašičnim listićima vrsta roda *Geranium* (Harborne i Williams, 2002; Okuda i sar., 1980; Tuominen i sar., 2013). Sadržaj geraniina u biljkama je najveći tokom cvetanja (Okuda i sar, 1980).

Geraniin je zastupljen i u biljkama familije *Euphorbiaceae*, kao i u vrsti *Erythroxylon coca* (Erythroxylaceae) (Okuda, 2005).



Slika 9. Geraniin

Takođe, iz listova *G. thunbergii* izolovan je askorgeraniin ili eleokarpusin – jedinjenje koje pripada grupi IV tanina i koje nastaje reakcijom kondenzacije između dehidroheksahidroksidifenske kiseline geraniina i askorbinske kiseline (Slika 10) (Okuda i sar., 1986).

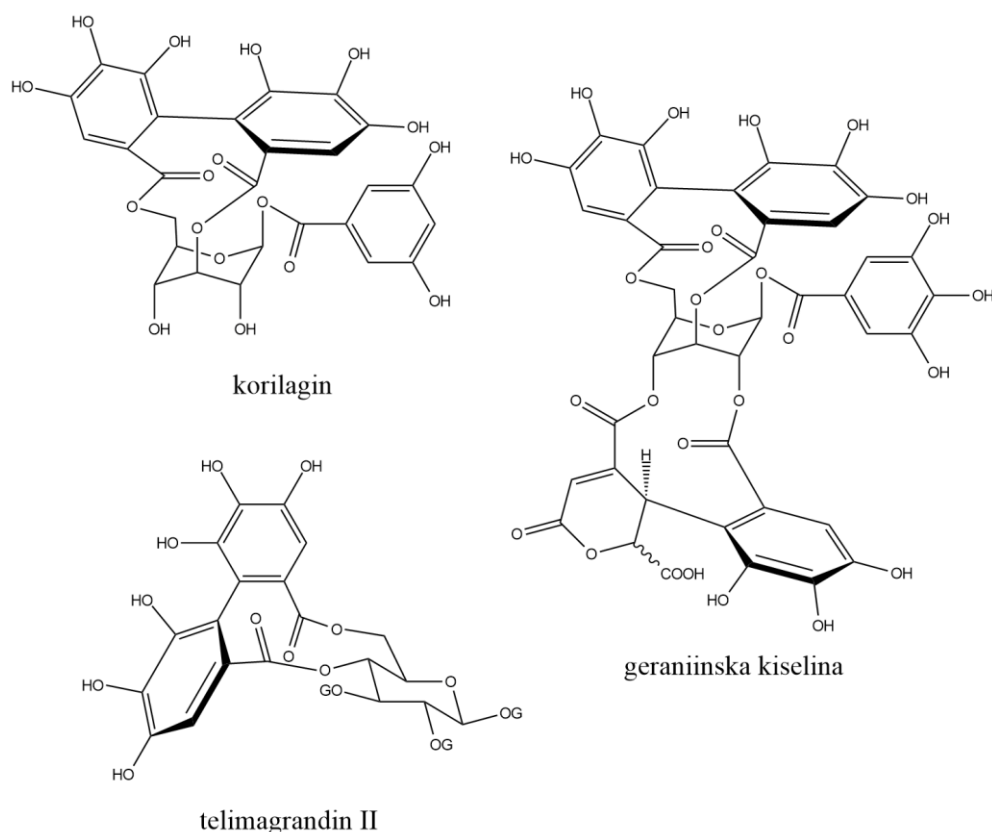


Slika 10. Askorgeraniin (eleokarpusin)

Pored geraniina u do sada ispitivanim vrstama roda *Geranium* utvrđeno je prisustvo i drugih elagnih tanina.

U listovima *G. pratense* i *G. sylvaticum* nađene su male količine korilagina, jedinjenja iz grupe II tanina, koji se sastoji iz glukoze, galne i heksahidroksidifenske kiseline (Slika 11). Takođe, u obe vrste, utvrđeno je i prisustvo geraniinske kiseline koja se razlikuje od geraniina po oksidovanoj DHHDP jedinici (Slika 11) (Moilanen i sar., 2015).

Telimagrandin II, koji pripada grupi II tanina, i koji se sastoji iz molekula glukoze, tri molekula galne kiseline i HHDP jedinice (Slika 11), izolovan je iz tučka i čašičnih listića *G. sylvaticum* (Tuominen i sar., 2017).



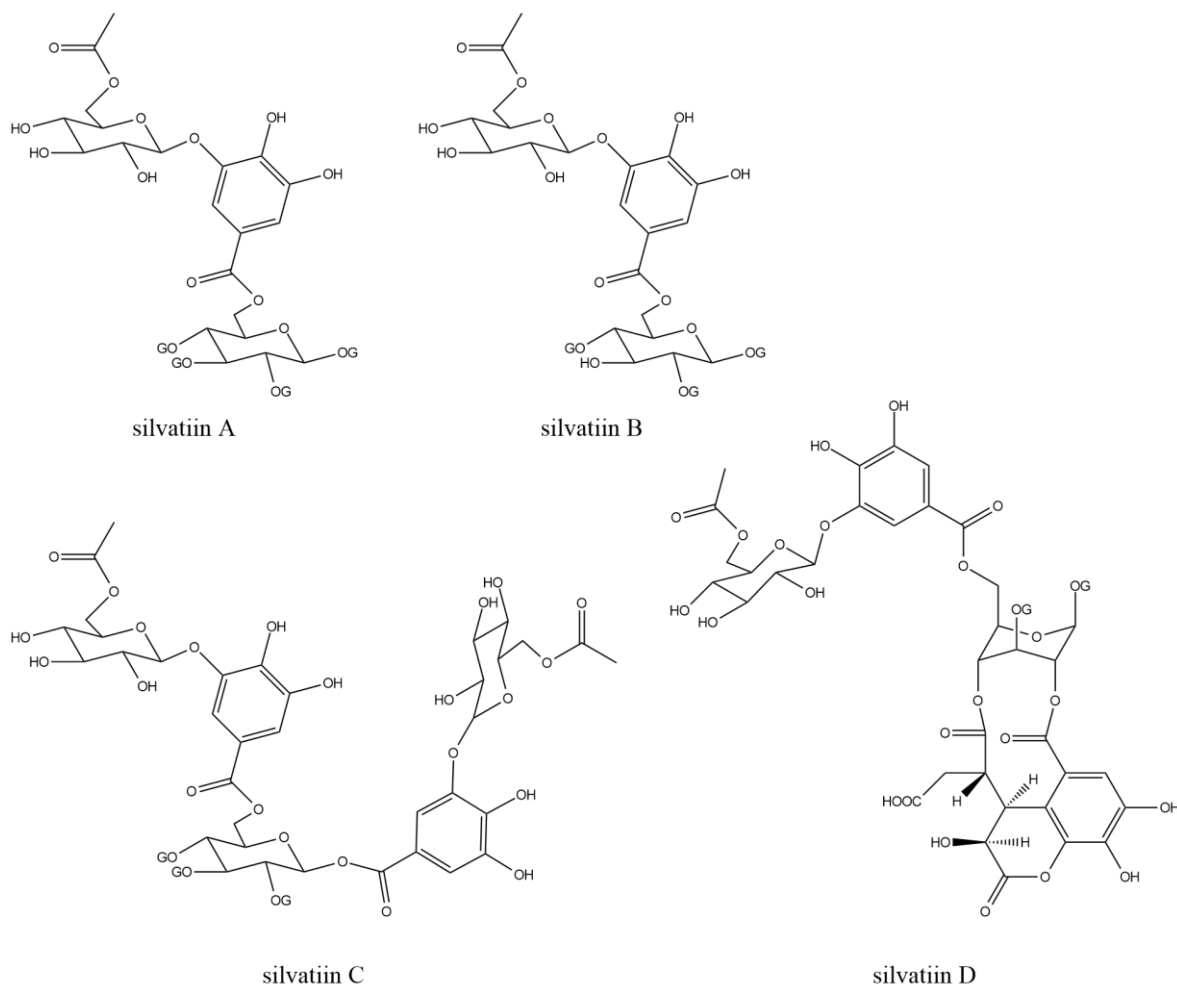
Slika 11. Strukture elagnih tanina prisutnih u vrstama roda *Geranium*

Iz kruničnih listića *G. sylvaticum* izolovan je elagni tanin karpinusin strukturno sličan geraniinu (Tuominen i sar., 2013), kao i silvatiini A, B, C i D, koji sadrže ostatke acetilglukoze vezane za galoilglukoze ili hebulinsku kiselinu (Slika 12) (Tuominen i sar., 2015).

Pored elagnih, vrste roda *Geranium* sadrže i galne tanine, kao grupu I tanina, i to mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, heksa- i heptagaloil derivate glukoze (Tuominen i sar., 2013).

Od *Geranium* vrsta koje su predmet izučavanja ove doktorske disertacije, *G. robertianum* je do sada najviše ispitana vrsta u pogledu hemijskog sastava. U prethodnim ispitivanjima, utvrđeno je prisustvo galnih tanina (mono-, di-, tri- i tetragaloilheksozidi) koji prema prethodno datoj klasifikaciji pripadaju grupi I tanina, zatim kastalagina i veskalagina, di- i trigaloil-heksahidroksidifenoilheksozida, mono- i trigaloil-*bis*(heksahidroksidifenoil)-heksozida i izomera galoil-heksahidroksidifenoilglukozida uključujući korilagin koji pripadaju grupi II tanina, kao i repandusidinske kiseline, izomera geraniina i filantusina B i C koji se klasifikuju kao grupa III tanina (Graća i sar., 2016a; Graća i sar., 2017; Sekowski i sar., 2014; Catarino i sar., 2017; Mavlyanov i sar., 1997).

Pored *G. robertianum* detaljnije je ispitan i hemijski sastav *G. pyrenaicum*. U različitim ekstraktima nadzemnog dela ove biljke utvrđeno je prisustvo galoil derivata heksoza i elagnih tanina, i to izomera geraniina, korilagina, pedunkulagina I i telimagrandina I (Świątek i sar., 2021).

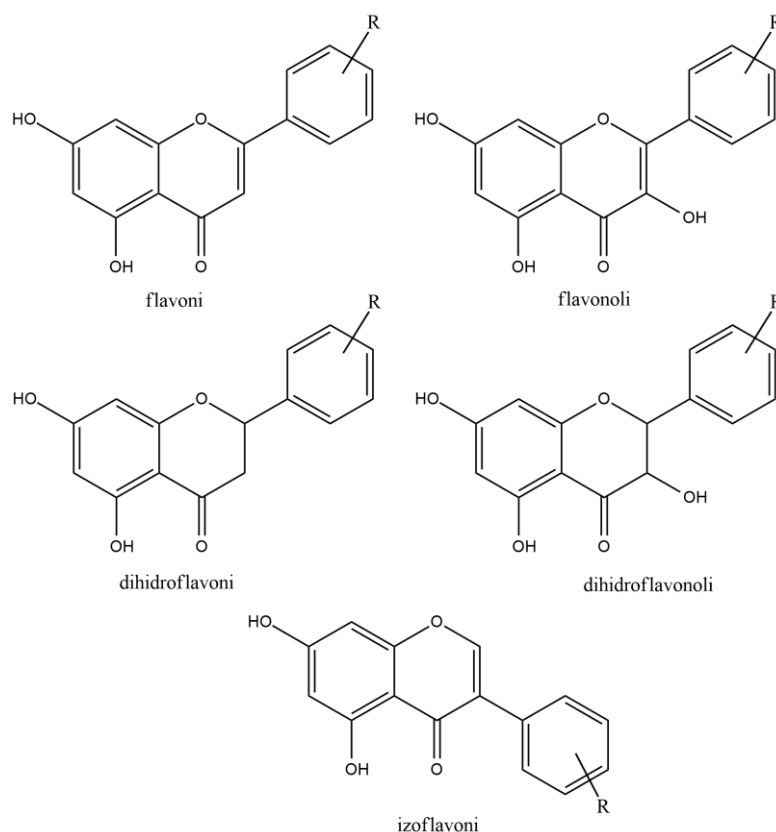


Slika 12. Silvatiini

Flavonoidi

Kao drugu najzastupljeniju grupu polifenolnih jedinjenja, vrste roda *Geranium* sadrže flavonoide.

Flavonoidi su derivati benzo- γ -pirona, a u biljkama mogu biti prisutni kao slobodni aglikoni ili u obliku heterozida. U osnovi aglikona svih flavonoida je benzenov prsten kondenzovan sa šestočlanim prstenom koji je u položaju 2 supstituisan fenil grupom (Slika 13). Šestočlani prsten je najčešće piron (flavoni i flavonoli) ili njegov dihidroderivat (flavanoni i flavanonoli). U slučaju izoflavonoida, šestočlani prsten je supstituisan fenil grupom u položaju 3. Razlika između flavona i flavonola je u prisustvu hidroksilne grupe u položaju 3, dok se dihidroderivati razlikuju od navedenih jedinjenja po prisustvu jednostruke veze u položaju 2. Flavonoidi često sadrže hidroksilne grupe u položaju 3,5,7,3',4' i 5'. U prirodi su zastupljeni i metil etri i acetil estri flavonoida. Heterozidi nastaju vezivanjem šećera najčešće za položaje 3,7,3' ili 4' (Narayana i sar., 2001; Harsten, 1983).



Slika 13. Klase flavonoida

Flavonoli kvercetin, kemferol i miricetin i njihovi derivati su najzastupljenija jedinjenja iz grupe flavonoida u biljkama roda *Geranium*. Osim toga, identifikovani su i luteolin i njegovi derivati (Leucuta i sar., 2005; Ivancheva i Petrova, 2000; Świątek i sar., 2021). Pregled identifikovanih jedinjenja iz grupe flavonoida u ispitivanim vrstama roda *Geranium* prikazan je u Tabeli 1.

Heterozidi kvercetina (kvercitrin, izokvercitrin, rutin i hiperozid) su široko zastupljeni u biljkama ovog roda (Miliauskas i sar., 2004; Fodorea i sar., 2004; Leucuta i sar., 2005; Ivancheva i Petrova, 2000; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020; Fodorea i sar., 2005a; Fodorea i sar., 2005b; Graća i sar., 2016a; Graća i sar., 2017; Catarino i sar., 2017; Tuominen i sar., 2015). Kvercetin i kemferol identifikovani su u vrstama *G. macrorrhizum* i *G. sanguineum* (Miliauskas i sar., 2004; Leucuta i sar., 2005; Fodorea i sar., 2004; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020). Prisustvo kvercetina i luteolina detektovano je i u *G. pyrenaicum* (Świątek i sar., 2021). Pored navedenih aglikona *G. sanguineum* sadrži i apigenin, miricetin i morin (Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020; Leucuta i sar., 2005). *O*-heterozidi luteolina identifikovani su u vrstama *G. lucidum* i *G. columbinum* (Ivancheva i Petrova, 2000). U listovima *G. phaeum* identifikovani su *C*-heterozidi: viteksin, izoviteksin, orientin, izoorientin i vicenin (Harborn i Williams, 2002).

Razlike u zastupljenosti flavonoida su u određenoj meri povezane sa geografskim poreklom vrsta ovog roda. Smatra se da je miricetin zastupljeniji u vrstama koje rastu u centralnoj Evropi, dok je u mediteranskim i američkim vrstama u visokim koncentracijama prisutan kemferol (Harborn i Williams, 2002).

Kao i u slučaju tanina, *G. robertianum* je vrsta koja je do sada najviše ispitana u pogledu flavonoidnog sastava. Pored navedenih jedinjenja, identifikovani su i deoksiheksozilheksozidi, dideoksiheksozilheksozidi i deoksiheksozilglukuronidi kemferola i kvercetina, deoksiheksozilpentozid kvercetina, diheksozid i diglukuronidi kemferola, kao i ramnozid i rutinozid kemferola i naringenin-7-*O*-glukozid (Graća i sar., 2016a; Graća i sar., 2017).

Kemferol-3-*O*-ramnozid identifikovan je i u vrstama *G. macrorrhizum* i *G. columbinum*, kao i miricetin-3-*O*-ramnozid. Kemferol-*O*-glukozid prisutan je i u vrstama *G. palustre* i *G. pyrenaicum* (Ivancheva i Petrova, 2000; Świątek i sar., 2021), a kvercetin-4'-*O*-glukozid (spireozid) u *G. macrorrhizum* (Milliauskas 2004). Utvrđeno je prisustvo kemferol-3-*O*-rutinozida i heterozida kvercetina u *G. pyrenaicum* (Świątek i sar., 2021). U vrstama *G. sanguineum* i *G. macrorrhizum* detektovan je i flavan-3-ol (katehin) (Pantev i sar., 2006; Nastić i sar., 2018; Abarova i sar., 2020).

Biljke roda *Geranium* sadrže i metilovane derivate aglikona. Ova lipofilna jedinjenja su pre svega zastupljena u žlezdanim trihomima. Ivancheva i Petrova (2000) su u acetonskim ekstraktima nadzemnih delova identifikovale 22 jedinjenja, i to aglikona i metilovanih derivata luteolina, kemferola, kvercetina i miricetina (Tabela 1). Razlike u distribuciji navedenih jedinjenja između ispitivanih vrsta mogu imati hemotaksonomski značaj, odnosno mogu poslužiti kao potencijalni hemotaksonomski karakteri za razlikovanje ovih vrsta.

Galoilovani derivati heterozida kvercetina i kemferola identifikovani su u vrsti *G. sylvaticum* i *G. pyrenaicum* (Tuominen i sar., 2013; Świątek i sar., 2021).

Fenolkarboksilne kiseline

Pored tanina i flavonoida, fenolkarboksilne kiseline su polifenolna jedinjenja prisutna u vrstama roda *Geranium* (Tabela 1).

Prema hemijskoj strukturi dele se na hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzoeve kiseline, detektovane u biljkama ovog roda su galna, elagna salicilna, gentizinska, siringinska, vanilinska i protokatehinska. *p*-Kumarna, kafeoilšikiminska, rozmarinska, kaftarna, kafena, ferulinska, sinapinska, cihorijumska i hlorogenska kiselina su derivati hidroksicimetne kiseline identifikovani u ispitivanim vrstama (Miliauskas i sar., 2004; Fodorea i sar., 2005a; Fodorea i sar., 2005b; Graća i sar., 2016a; Catarino i sar., 2017; Fodorea i sar., 2004; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020; Świątek i sar., 2021; Nastić i sar., 2018; Salih, 2019).

Tabela 1. Prethodno identifikovana fenolna jedinjenja u ispitivanim *Geranium* vrstama

Jedinjenje	Vrsta ^a								Literatura
	Gmac	Gph	Grob	Gpal	Gsan	Gpyr	Gcol	Gluc	
Fenolkarboksilne kiseline									
hina kiselina			+		+	+			Catarino i sar., 2017; Pantev i sar., 2006; Świątek i sar., 2021
3- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina (hlorogenska kiselina)			+		+			+	Graća i sar., 2016a; Graća i sar., 2017; Nastić i sar., 2018; Salih, 2019; Leucuta i sar., 2005 Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020
5- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina			+						Graća i sar., 2017
3- <i>p</i> -kumaroilhina kiselina			+						
3- <i>O</i> -feruloilhina kiselina			+						
kafeoilšikiminska kiselina			+						
galoilšikiminska kiselina						+			Świątek i sar., 2021
protokatehinska kiselina	+		+						Grigoraviciute i sar., 2018

Jedinjenje	Vrsta ^a								Literatura
	Gmac	Gph	Grob	Gpal	Gsan	Gpyr	Gcol	Gluc	
vanilinska kiselina	+		+						Grača i sar., 2017; Nastić i sar., 2018
<i>p</i> -kumarna kiselina	+		+		+				Grača i sar., 2017; Leucuta i sar., 2005
galna kiselina	+		+				+		Miliauskas i sar., 2004; Sharopov i sar., 2017; Catarino i sar., 2017; Nastić i sar., 2018; Świątek i sar., 2021
elagna kiselina	+		+		+	+			Miliauskas i sar., 2004; Fodorea i sar., 2005a; Fodorea i sar., 2005b; Grača i sar., 2016a; Catarino i sar., 2017; Fodorea i sar., 2004; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020; Świątek i sar., 2021
brevifolin karboksilna kiselina			+				+		Catarino i sar., 2017; Świątek i sar., 2021
rozmarinska kiselina	+								Miliauskas i sar., 2004
galoilhina kiselina	+		+				+		Miliauskas i sar., 2004; Catarino i sar., 2017; Świątek i sar., 2021
kaftarna kiselina	+		+		+	+			Fodorea i sar., 2005a; Fodorea i sar., 2005b; Fodorea i sar., 2004; Leucuta i sar., 2005
kafena kiselina	+				+				Fodorea i sar., 2004; Leucuta i sar., 2005; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020
ferulinska kiselina	+				+	+			Nastić i sar., 2018; Leucuta i sar., 2005; Świątek i sar., 2021
siringinska kiselina								+	Salih, 2019
salicilna kiselina								+	
sinapinska kiselina					+				Leucuta i sar., 2005
cihorijumska kiselina					+				
gentizinska kiselina					+				
Flavonoidi									
(-)-katehin					+				Abarova i sar., 2020; Pantev i sar., 2006
(+)-katehin	+				+				Nastić i sar., 2018; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020
apigenin					+				Abarova i sar., 2020; Pantev i sar., 2006; Leucuta i sar., 2005

Jedinjenje	Vrsta ^a								Literatura
	Gmac	Gph	Grob	Gpal	Gsan	Gpyr	Gcol	Gluc	
kvercetin	+		+		+	+	+		Grigoraviciute i sar., 2018; Miliauskas i sar., 2004; Paun i sar., 2011; Leucuta i sar., 2005; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020; Świątek i sar., 2021; Ivancheva i Petrova, 2000
kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid (izokvercitrin)	+		+	+	+	+		+	Miliauskas i sar., 2004; Fodorea i sar., 2004; Fodorea i sar., 2005a; Fodorea i sar., 2005b; Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017; Leucuta i sar., 2005; Ivancheva i Petrova, 2000
kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid (hiperozid)	+		+		+	+			Miliauskas i sar., 2004; Fodorea i sar., 2004; Fodorea i sar., 2005a; Fodorea i sar., 2005b; Leucuta i sar., 2005; Ivancheva i Petrova, 2000; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020
kvercetin- <i>O</i> -glukuronid						+			Świątek i sar., 2021
kvercetin- <i>O</i> -heksozid						+			
kvercetin- <i>O</i> -galoilglukozid						+			
kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozid (kvercitrin)	+		+	+	+	+		+	Ivancheva i Petrova, 2000; Fodorea i sar., 2004; Leucuta i sar., 2005; Fodorea i sar., 2005b
kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (rutin)	+		+		+			+	Graça i sar., 2016a; Catarino i sar., 2017; Fodorea i sar., 2004; Leucuta i sar., 2005; Fodorea i sar., 2005b; Ivancheva i Petrova, 2000; Abarova i sar., 2020; Graça i sar., 2017
3'-metiletar kvercetin-3- <i>O</i> -glukozida						+			Ivancheva i Petrova, 2000
kvercetin-4'- <i>O</i> -glukozid (spireozid)	+								Miliauskas i sar., 2004
kvercetin- <i>O</i> -dideoksiheksozilheksozid			+						Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017
kvercetin- <i>O</i> -deoksiheksozilheksozid			+						Graça i sar., 2017
kvercetin- <i>O</i> -deoksiheksozilglukuronid			+						
kvercetin- <i>O</i> -deoksiheksozilpentozid			+						
6-metoksikvercetin (patuletin)					+				Leucuta i sar., 2005

Jedinjenje	Vrsta ^a								Literatura
	Gmac	Gph	Grob	Gpal	Gsan	Gpyr	Gcol	Gluc	
kemferol	+		+		+	+			Grigoraviciute i sar., 2018; Fodorea i sar., 2004; Paun i sar., 2014; Pantev i sar., 2006; Leucuta i sar., 2005; Ivancheva i Petrova, 2000
kemferol-3- <i>O</i> -glukozid (astragalin)			+	+		+			Kartnig i Bucar-Stachel, 1991; Ivancheva i Petrova, 2000; Świątek i sar., 2021
kemferol-3- <i>O</i> -ramnozid	+		+					+	Ivancheva i Petrova, 2000
kemferol-3- <i>O</i> -rutinozid (nikotiflorin)			+			+			Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017; Świątek i sar., 2021
kemferol- <i>O</i> -acetilglukuronil- <i>O</i> -malonilglukuronid			+						Graça i sar., 2017
kemferol- <i>O</i> -galoilglukozid						+			Świątek i sar., 2021
kemferol- <i>O</i> -(acetilpentozil)pentozid			+						Graça i sar., 2017
kemferol- <i>O</i> -diglukuronid (1)			+						
kemferol- <i>O</i> -diglukuronid (2)			+						
kemferol- <i>O</i> -dihexozid			+						
kemferol- <i>O</i> -dideoksiheksozilheksozid			+						Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017
kemferol- <i>O</i> -deoksiheksozilglukuronid			+						Graça i sar., 2017
kemferol- <i>O</i> -deoksiheksozilheksozid			+						Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017
miricetin					+				Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020
miricetin-3- <i>O</i> -ramnozid	+							+	Ivancheva i Petrova, 2000
morin					+				Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020
naringenin-7- <i>O</i> -glukozid			+						Graça i sar., 2017;
luteolin					+	+			Leucuta i sar., 2005; Świątek i sar., 2021
luteolin-7- <i>O</i> -glukozid								+	Ivancheva i Petrova, 2000
luteolin-3'- <i>O</i> -ramnozid								+	
luteolin-4'- <i>O</i> -ramnozid								+	
viteksin (apigenin-8- <i>C</i> -glukozid)		+							Harborn i Williams, 2002
izoviteksin (apigenin-6- <i>C</i> -		+							

Jedinjenje	Vrsta ^a								Literatura
	Gmac	Gph	Grob	Gpal	Gsan	Gpyr	Gcol	Gluc	
glukozid)									
orientin (luteolin-8-C-glukozid)		+							
izoorientin (luteolin-6-C-glukozid)		+							
vicenin (apigenin-6,8-C-diglukozid)		+							
<i>Metilovani flavonoidi</i>									
kemferol-3-metiletar	+		+					+	Ivancheva i Petrova, 2000
kemferol-3'-metiletar	+							+	
kemferol-4'-metiletar			+	+		+		+	
kemferol-3,7-dimetiletar (kumatakenin)	+							+	
kemferol-3,4'-dimetiletar (ermanin)	+							+	
kemferol-7,4'-dimetiletar	+								
kemferol-3,7,4'-trimetiletar	+		+					+	
kvercetin-3-metiletar	+					+			
kvercetin-3'-metiletar (izoramnetin)						+			
kvercetin-7-metiletar (ramnetin)					+				Abarova i sar., 2020
kvercetin-3,7-dimetiletar	+		+					+	Harborn i Williams, 2002
kvercetin-3,3'-dimetiletar	+		+	+				+	Ivancheva i Petrova, 2000
kvercetin-3',4'-dimetiletar (ramnazin)	+								
kvercetin-7,3'-dimetiletar	+								
kvercetin-3,7,3'-trimetiletar	+		+					+	
kvercetin-7,3',4'-trimetiletar	+							+	
kvercetin-3,7,3',4'-tetrametiletar (retusin)	+				+			+	Abarova i sar., 2020; Pantev i sar., 2006
miricetin					+			+	Ivancheva i Petrova, 2000
miricetin-7,3',4'-trimetiletar	+							+	
miricetin-3,7,3',4'-tetrametiletar	+							+	
Tanini									
galoilheksoza	+		+			+			Grigoraviciute i sar., 2018; Catarino i sar., 2017; Świątek i sar., 2021

Jedinjenje	Vrsta ^a								Literatura
	Gmac	Gph	Grob	Gpal	Gsan	Gpyr	Gcol	Gluc	
digaloilglukoza			+			+			Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017
digaloilheksoza			+						Catarino i sar., 2017; Świątek i sar., 2021
trigaloilglukoza (izomeri)			+						Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017
tetragaloilglukoza (izomeri)			+						Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017
pentagaloilglukoza			+						Graça i sar., 2017
geraniin (izomeri)			+			+			Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017; Catarino i sar., 2017; Świątek i sar., 2021
galoil-HHDP-glukoza			+			+			Graça i sar., 2017; Świątek i sar., 2021
digaloil-HHDP-glukoza (izomeri)			+			+			Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017; Świątek i sar., 2021
trigaloil-HHDP-glukoza (izomeri)					+				Mavlyanov i sar., 1997
trigaloil-HHDP-heksoza			+						Catarino i sar., 2017
pentozid elagne kiseline			+						Graça i sar., 2016a
kastalagin/veskalagin			+						Graça i sar., 2016a; Graça i sar., 2017
galoil-bis-HHDP-glukoza			+			+			Graça i sar., 2017; Świątek i sar., 2021
trigaloil-bis-HHDP-glukoza					+				Mavlyanov i sar., 1997; Sekowski i sar., 2014
trigaloil-bis-HHDP-heksoza			+						Catarino i sar., 2017
diheksozid elagne kiseline			+						Graça i sar., 2017; Catarino i sar., 2017
filantusiin B (izomeri)			+						Catarino i sar., 2017
filantusiin C			+						
korilagin			+						
repandusinska kiselina A			+						
<i>p</i> -kumaroilheksozid elagne kiseline			+						

^a Gmac - *G. macrorrhizum*, Gph - *G. phaeum*, Grob - *G. robertianum*, Gpal - *G. palustre*, Gsan - *G. sanguineum*, Gpyr - *G. pyrenaicum*, G.col - *G. columbinum*, Gluc - *G. lucidum*

Etarska ulja/isparljiva jedinjenja

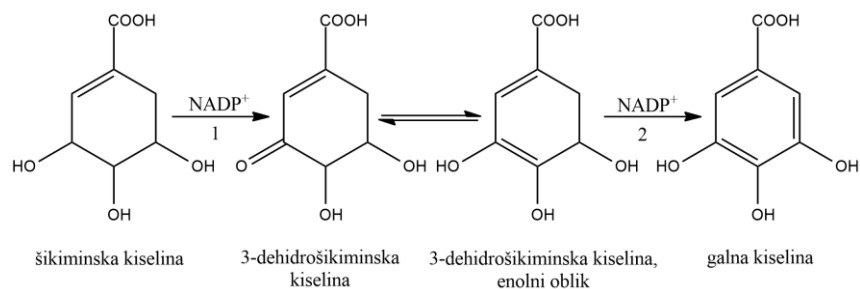
Generalno, vrste roda *Geranium* se smatraju siromašnim u pogledu sadržaja etarskog ulja. Sadržaj isparljivih jedinjenja je različit u zavisnosti od biljne vrste, kao i od biljnog organa. Kreće se u opsegu od 0,006% u nadzemnim delovima vrste *G. robertianum* do 0,09% u korenu vrste *G. columbinum*. U isparljivim frakcijama biljaka ovog roda dominantnu klasu jedinjenja najčešće predstavljaju masne kiseline i njihovi derivati (Radulović i sar., 2010; Radulović i sar., 2011; Radulović i sar., 2012; Radulović i sar., 2013).

Nadzemni delovi vrste *G. macrorrhizum* se u Bugarskoj koriste za dobijanje etarskog ulja koje je komercijalno dostupno i koristi se u kozmetičke svrhe. Kao dominantno jedinjenje u ovom etarskom ulju navodi se seskviterpen germakron (Chalchat i sar., 2002; Radulović i sar., 2010). Rezultati ispitivanja sastava etarskih ulja *G. robertianum* su različiti. Radulović i sar. (2012) navode masne kiseline i njihove derivate kao dominantnu grupu jedinjenja u etarskim uljima nadzemnog i podzemnog dela ove vrste, dok drugi autori navode linalol kao glavni sastojak etarskog ulja nadzemnog dela (Gębarowska i sar., 2017; Pedro i sar., 1992). Ovo jedinjenje se navodi i kao jedan od glavnih sastojaka etarskog ulja izolovanog iz cvetova *G. sanguineum* (Hammami i sar., 2011). Prema Radulović i sar. (2012), dominantna jedinjenja u etarskom ulju izolovanom iz cele biljke *G. sanguineum* su heksadekanska kiselina, heksahidrofarnetilaceton i fenilacetaldehid. Renda i sar. (2016) su identifikovali heksadekansku kiselinu, germakren D i (*E*)-kariofilen kao glavne sastojke ulja nadzemnog dela *G. pyrenaicum*. Chalchat i sar. (2002) navode značajan sadržaj piperitona u etarskom ulju nadzemnog dela *G. phaeum*, dok su prema Radulović i sar. (2013) masne kiseline i njihovi derivati dominantni sastojci etarskih ulja podzemnog i nadzemnog dela ova vrste. Heksadekanska kiselina je najzastupljenija i u etarskom ulju izolovanom iz cele biljke *G. lucidum* (Radulović i sar., 2011). Pored ove kiseline, u etarskom ulju nadzemnog dela *G. columbinum* u značajnoj količini zastupljen je i heksahidrofarnetilaceton (Radulović i sar., 2011).

4.1. Biosinteza sekundarnih metabolita biljaka roda *Geranium*

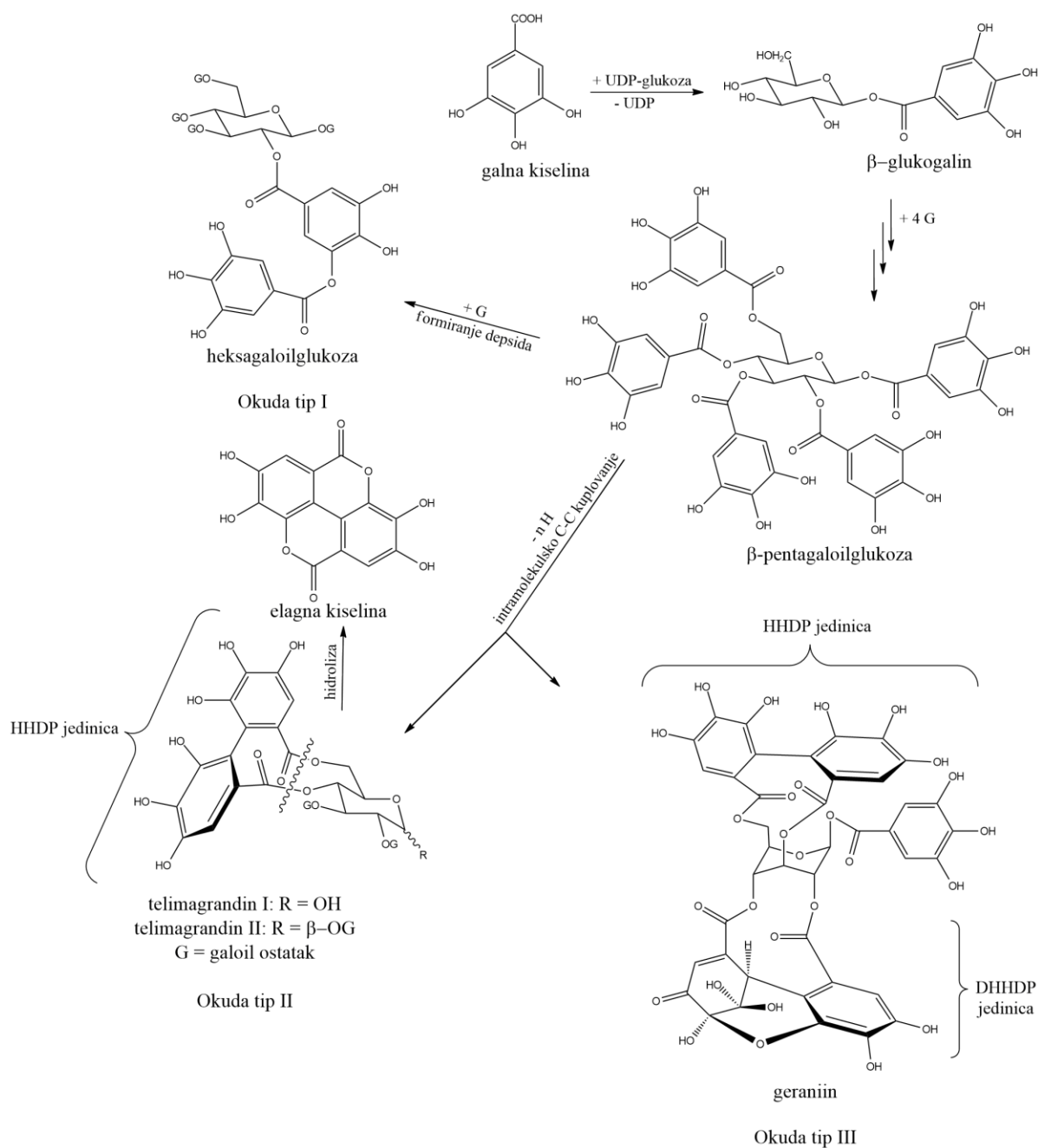
Prekursori sekundarnih metabolita sa aromatičnom strukturom nastaju biosintetskim putem preko šikiminske kiseline. Šikimatni put počinje kondenzacijom i ciklizacijom fosfoenolpiruvata i eritroza-4-fosfata pri čemu preko 3-dehidrohina kiseline nastaje šikiminska kiselina.

Hidrolizujući tanini nastaju iz 3-dehidrošikiminske kiseline koja se formira oksidacijom šikiminske kiseline pod uticajem šikimat-dehidrogenaze. U sledećem koraku, enolni tautomer dehidrošikiminske kiseline podeleže oksidaciji pod uticajem dehidrošikimat-dehidrogenaze pri čemu nastaje galna kiselina (Slika 14) (Ossipov i sar., 2003).



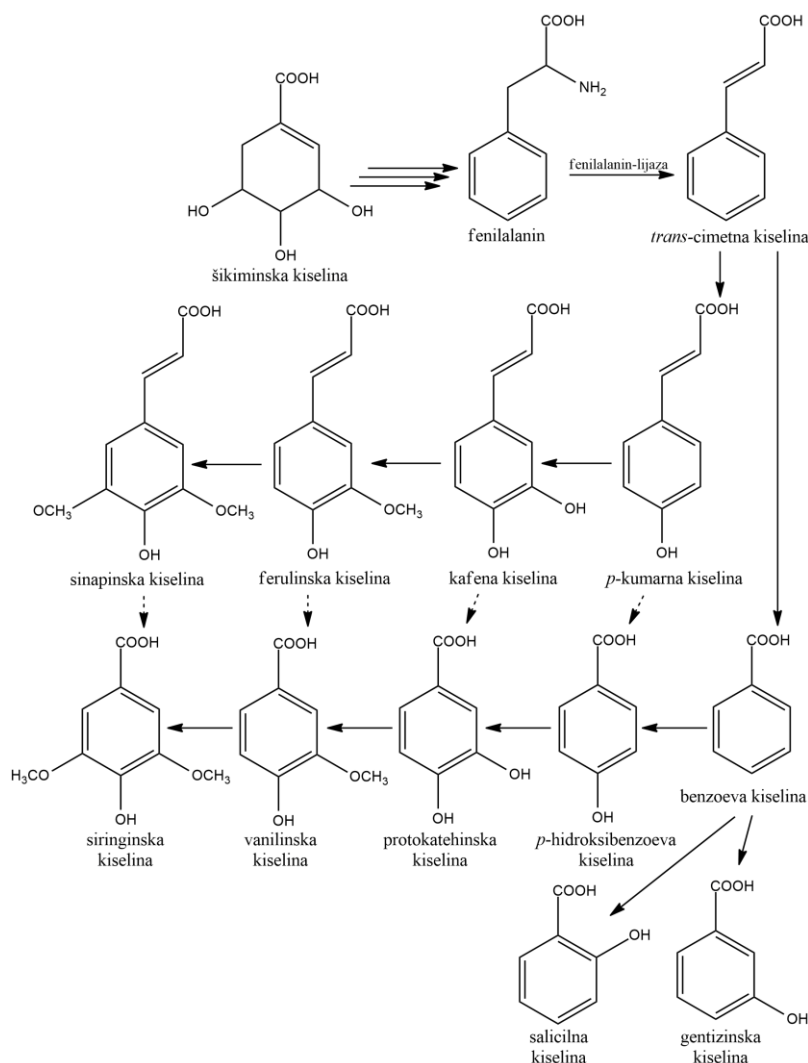
Slika 14. Sinteza galne kiseline iz šikiminske kiseline (Ossipov i sar., 2003) (1 – šikimat-dehidrogenaza, 2 – dehidrošikimat-dehidrogenaza)

Esterifikacijom hidroksilne grupe glukoze galnom kiselinom nastaje β -glukogalin koji ima dvostruku ulogu – kao supstrat za dalju esterifikaciju i kao donor galoil jedinica. Ovo jedinjenje se kroz niz specifičnih reakcija prevodi u penta-*O*-galoilglukoza (β -PGG) koja predstavlja ključno intermedijerno jedinjenje u sintezi galnih i elagnih tanina. Galni tanini nastaju daljim galoilovanjem β -PGG i karakterišu se prisustvom jednog ili više meta-depsidnih digaloil ostataka (npr. 2-*O*-digaloil-1,3,4,6-tetra-*O*-galoil- β -D-glukopiranoza). Sa druge strane, β -PGG podleže reakcijama oksidativnog kuplovanja pri čemu dolazi do stvaranja kovalentnih veza između dve prostorno bliske galoil grupe. Na ovaj način nastaje HHDP-biaril jedinica koja čini strukturnu osnovu elagnih tanina (Slika 15). Tanini sa HHDP-biaril grupom se klasifikuju u grupu II tanina (npr. telimagrandin I i II). Oksidacijom HHDP jezgra nastaje DHHDP jedinica koja je u osnovi tipa III hidrolizujućih tanina (npr. geraniin). Kao što je već pomenuto, tanini IV grupe nastaju dodatnim promenama koje uključuju i esterifikaciju DHHDP jedinice (Ky i sar., 2016).



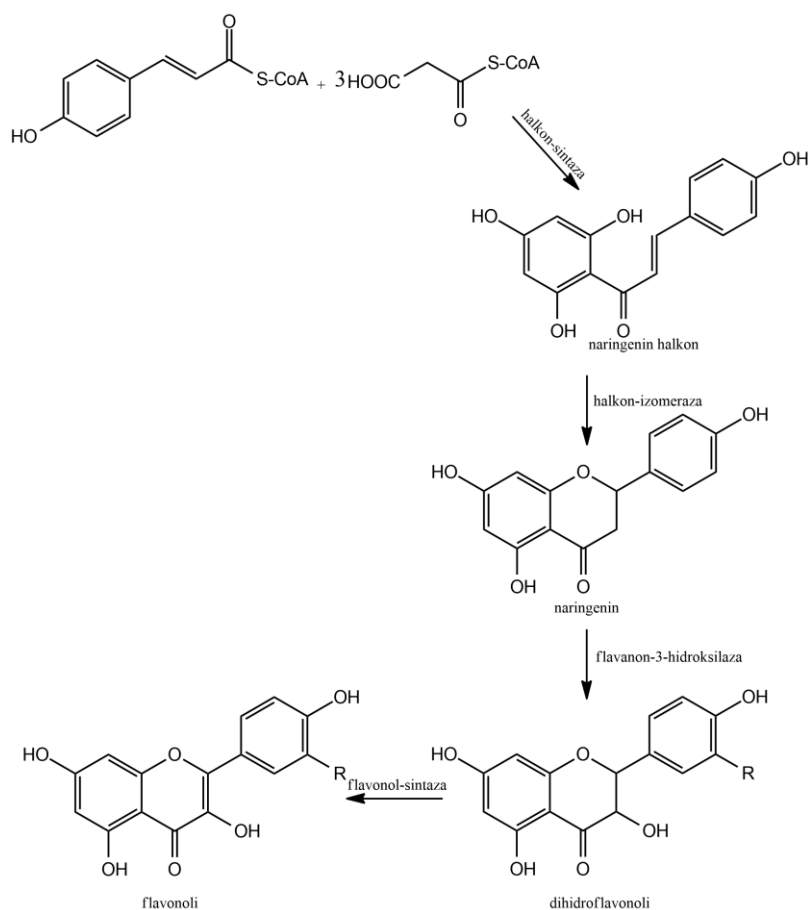
Slika 15. Sintaza hidrolizujućih tanina (Jourdes i sar., 2013; Ky i sar., 2016)

Fenolkarboksilne kiseline nastaju takođe biosintetskim putem preko šikiminske kiseline. Od šikiminske kiseline nizom metaboličkih reakcija nastaju aromatične aminokiseline, L-fenilalanin i L-triptofan. L-fenilalanin pod uticajem fenilalaninske amonijak-lijaze (deaminaze) podleže deaminaciji do *trans*-cimetne kiseline koja se dalje reakcijom hidroksilacije prevodi u *p*-kumarnu kiselinu. Hidroksilacijom i oksimetilovanjem *p*-kumarne kiseline nastaju kafena i ferulinska kiselina. Ovako nastali metaboliti imaju C6-C3 strukturu i predstavljaju prekursore drugih fenolnih jedinjenja. Gubitkom 2 C atoma, *trans*-cimetna kiselina se prevodi u benzoevu kiselinu koja reakcijama hidroksilacije i oksimetilovanja daje druge fenolkarboksilne kiseline (salicilna, vanilinska i dr.) (Slika 16) (Kougan i sar., 2013; Kumar i Goel, 2019).



Slika 16. Biosinteza fenolkarboksilnih kiselina (Kougan i sar., 2013; Kumar i Goel, 2019)

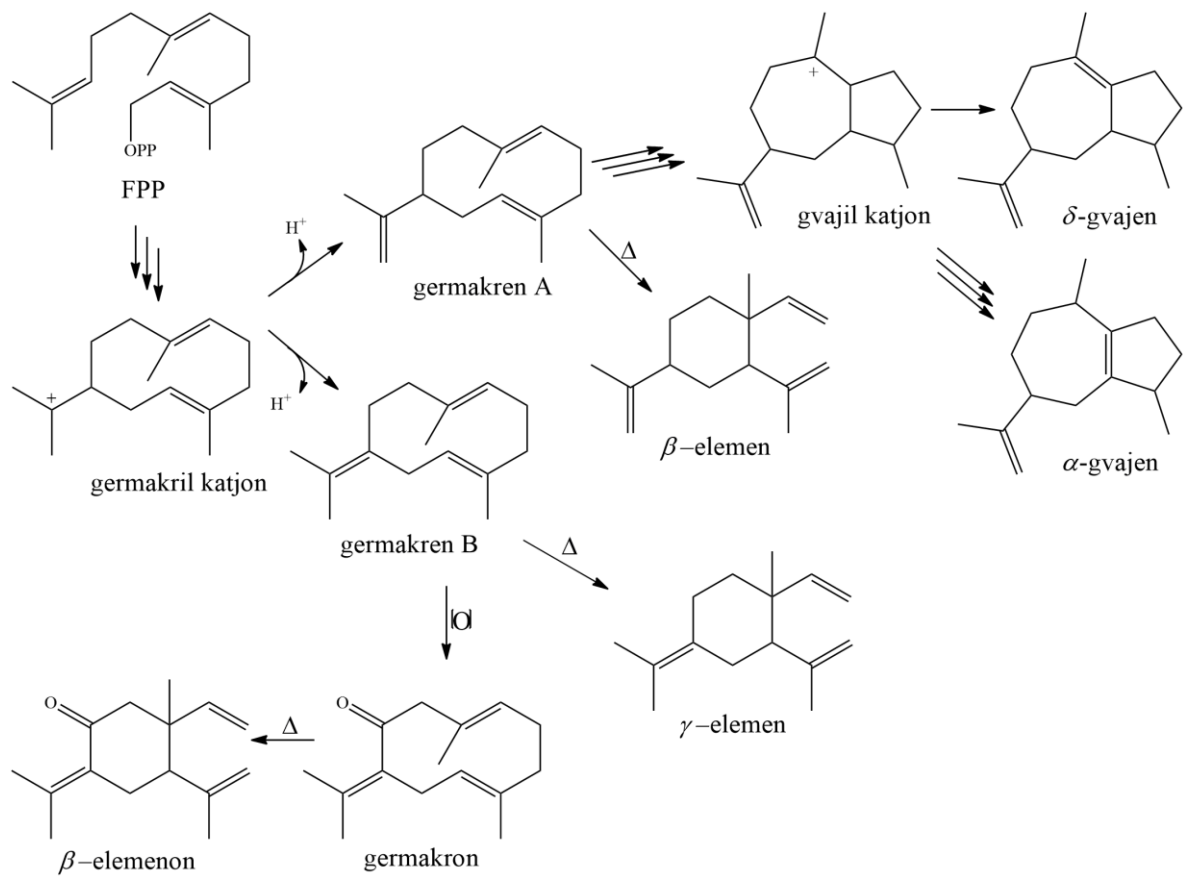
Biosinteza flavonoida počinje od *p*-kumaroil-CoA koji nastaje iz fenilalanina i koji u kondenzaciji sa malonil-CoA pod uticajem enzima halkon-sintaze daje halkon. Nastali halkon se pod uticajem enzima izomeraza, reduktaza, hidroksilaza i dioksigenaza dalje transformiše do određenih klasa flavonoida. Na kraju, pod uticajem odgovarajućih transferaza nastaju heterozidi, acil ili metil derivati flavonoida (Slika 17) (Falcone i sar., 2012).



Slika 17. Biosinteza flavonoidnih aglikona (Burbulis i Winkel-Shirley, 1999; Falcone i sar., 2012)

Terpeni nastaju iz izoprenskih jedinica sastavljenih od 5 atoma ugljenika. Početno jedinjenje u sintezi terpena je acetil-CoA pri čemu kondenzacijom 3 molekula ovog jedinjenja nastaje mevalonska kiselina koja predstavlja prekursor gradivnih jedinica terpena: izopentenilpirofosfata (IPP) i dimetilalilpirofosfata (DMAPP). Kondenzacijom IPP i DMAPP nastaje skelet od 10 ugljenikovih atoma geranilpirofosfat (GPP) iz koga dalje nastaju monoterpeni. Spajanjem GPP i dodatne jedinice od 5 C atoma nastaje farnezilpirofosfat (FPP) – prekursor seskviterpena, dok ugradnjom još jedne 5 C jedinice nastaje geranilgeranilpirofosfat (GGPP) kao prekursor diterpena. Tri- i tetraterpeni nastaju dimerizacijom FPP, odnosno GGPP (Habtemariam, 2019).

Sinteza germakrona kao dominantnog jedinjenja u etarskom ulju podzemnog dela *G. macrorrhizum* je predstavljena na slici 18. Iz FPP nastaje germakril katjon koji se dalje konvertuje do germakrena A i germakrena B. Daljim metabolizmom germakrena A nastaju seskviterpeni β -elemen i α - i δ -gvajen, dok se germakren B dalje transformiše do germakrona i γ -elemena (Radulović i sar., 2010).



Slika 18. Biosinteza germakrona (Radulović i sar., 2010)

5. Etnomedicinska primena biljaka roda *Geranium*

Vrste roda *Geranium* imaju značajnu etnomedicinsku primenu na Balkanu gde se smatraju simbolom opšteg zdravlja. Najčešća primena ovih biljaka je za ublažavanje simptoma inflamatornih bolesti i digestivnih tegoba.

Zdravac (*G. macrorrhizum*) i živa trava (*G. robertianum*) su vrste čija je primena najviše dokumentovana. Rizom zdravca se smatra narodnim lekom za lečenje upala sluznice organa za varenje (Tucakov, 1997). Pored toga, navodi se primena kod uznemirenosti, hipertenzije, grčeva i slabosti srčanog mišića (Ivancheva i Stantcheva, 2000). Nadzemni delovi ove biljke se takođe koriste kod gastrointestinalnih tegoba, hipertenzije i kolika, ali i kod zapaljenskih promena na koži i sluzokoži, za jačanje imuniteta i dr. (Menković i sar., 2014; Menković i sar., 2011; Živković i sar., 2020; Papović i sar., 2021; Savić i sar., 2019; Matejić i sar., 2020). Koren žive trave (*G. robertianum*) ima tradicionalnu upotrebu kod neplodnosti (Živković i sar., 2021), dok se nadzemni delovi koriste kod gastrointestinalnih tegoba, bolesti bubrega, dijabetesa, kolika, hormonskih poremećaja, za zarastanje rana i dr. (Živković i sar., 2021; Menković i sar., 2014; Menković i sar., 2011; Bnouham i sar., 2002).

Koren *G. sanguineum* (narodni naziv devojačko oko) se u narodu primenjuje kod hipertenzije, inflamatornih i infektivnih stanja (Ivancheva i Stantcheva, 2000; Pantev i sar., 2006).

Pregled etnomedicinske primene ispitivanih vrsta na Balkanskom poluostrvu dat je u Tabeli 2.

Tabela 2. Etnomedicinska upotreba ispitivanih biljaka roda *Geranium*

Vrsta	Deo biljke	Upotreba	Oblik primene	Zemlja	Literatura
<i>G. macrorrhizum</i>	rizom	intestinalni mukozitis	-*	Srbija	Tucakov, 1997
<i>G. macrorrhizum</i>	rizom	hipertenzija, sedativ, kardiotonik, spazmolitik	-	Bugarska	Ivancheva i Stantcheva, 2000
<i>G. macrorrhizum</i>	nadzemni delovi	inflamacija kože i sluzokože	-	Crna Gora	Menković i sar., 2014; Menković i sar., 2011
<i>G. macrorrhizum</i>	list i cvet	digestivne tegobe	infuz	Srbija	Živković i sar., 2020
<i>G. macrorrhizum</i>	-	hipertenzija, dijabetes, Parkinsonova bolest, bronhitis, “za podmlađivanje”	-	Srbija	Papović i sar., 2021
<i>G. macrorrhizum</i>	nadzemni delovi	gastrointestinalne tegobe	infuz	BiH	Savić i sar., 2019
<i>G. macrorrhizum</i>	nadzemni delovi, cvet, list	za jačanje imuniteta, infekcije oka, bolovi u stomaku, znojenje,	infuz, tinktura, obloga	Srbija	Matejić i sar., 2020

Vrsta	Deo biljke	Upotreba	Oblik primene	Zemlja	Literatura
		bubrežne kolike, nesаница			
<i>G. robertianum</i>	nadzemni delovi	dijareja, gastritis, upala žučne kese i žučnih puteva, bubrega i bešike, za zarastanje rana i kod blagih osipa	-	Crna Gora	Menković i sar., 2014; Menković i sar., 2011
<i>G. robertianum</i>	koren, list	hipoholesterolemik	dekoka	Izrael	Said i sar., 2002
<i>G. robertianum</i>	list, cvet, stabljika	hipoglikemik, tonik, spazmolitik, kod kancera i bolesti bubrega	infuz	Maroko	Bnouham i sar., 2002
<i>G. robertianum</i>	nadzemni delovi	problemi sa sinusima	-	Crna Gora	Menković i sar., 2014
<i>G. robertianum</i>	nadzemni delovi	hormonski poremećaji	infuz	Srbija	Živković i sar., 2021
<i>G. robertianum</i>	koren	neplodnost	dekoka, tinktura	Srbija	Živković i sar., 2021
<i>G. robertianum</i>	nadzemni delovi	intestinalne bolesti kod svinja	dekoka	Srbija	Jarić i sar., 2007
<i>G. robertianum</i>	list	kancer	infuz	-	Breuss, 1955
<i>G. robertianum</i>	nadzemni delovi	ritualne svrhe	infuz	Srbija	Matejić i sar., 2020
<i>G. phaeum</i>	nadzemni delovi	ritualne svrhe	-	Srbija	Matejić i sar., 2020
<i>G. sanguineum</i>	koren	hipertenzija, antivirotik i imunostimulans	liofilizat	Bugarska	Ivancheva i Stantcheva, 2000
<i>G. sanguineum</i>	koren	inflamatorna i infektivna stanja	vodeni i alkoholni ekstrakti	Bugarska	Pantev i sar., 2006
<i>G. sanguineum</i>	-	svrab, kožne lezije	-	Bugarska	Jordanov i sar., 1973

* - podaci nisu dostupni

6. Farmakološka aktivnost biljaka roda *Geranium*

Vrste roda *Geranium* bile su predmet brojnih ispitivanja različitih farmakoloških aktivnosti kao što su: antioksidantna, antimikrobna, citotoksična, antiinflamatorna i dr. (Radulović i sar., 2012; Sharopov i sar., 2017; Amaral i sar., 2009; Neagu i sar., 2010; Neagu i sar., 2017; Paun i sar., 2011; Catarino i sar., 2017; Ben Jemia i sar., 2013; Sokmen i sar., 2005; Pavlova i sar., 2019; Świątek i sar., 2021; Wafa i sar., 2017; Nikolova i sar., 2010; Khavrona i sar., 2018; Özçelik i sar., 2010; Lima, 2009; Hammami i sar., 2011; Radulović i sar., 2010; Radulović i sar., 2011; Radulović i sar., 2014; Renda i sar., 2016; Graça i sar., 2016a; Paun i sar., 2014; Georgiev i sar., 2022). Do sada najviše ispitane vrste su *G. macrorrhizum* i *G. robertianum* i to u pogledu antioksidantne i antimikrobne aktivnosti (Radulović i sar., 2012; Sharopov i sar., 2017; Amaral i sar., 2009; Neagu i sar., 2010; Neagu i sar., 2017; Paun i sar., 2011; Catarino i sar., 2017; Ben Jemia i sar., 2013; Graça i sar., 2016a; Özçelik i sar., 2010; Lima, 2009; Radulović i sar., 2010; Radulović i sar., 2012; Radulović i sar., 2014). Ipak, nedostaju podaci o farmakološkoj aktivnosti pojedinih vrsta koje su predmet proučavanja ove doktorske disertacije, naročito u pogledu aktivnosti podzemnih organa, koje su ređe ispitivane.

6.1. Antioksidantna aktivnost

Dosadašnja ispitivanja farmakološke aktivnosti vrsta roda *Geranium* najvećim delom se odnose na ispitivanje antioksidantnog delovanja u *in vitro* testovima, u kojima je utvrđen njihov značajan antioksidantni potencijal.

Metanolni ekstrakti nadzemnog i podzemnog dela *G. macrorrhizum* ispoljili su značajnu sposobnost neutralizacije DPPH ($178,7 \pm 1,8$ i $1064,4 \pm 1,8$ mg troloks ekvivalenata/g) i ABTS^{•+} radikala ($323,3 \pm 1,2$ i $169,5 \pm 1,1$ mg troloks ekvivalenata/g). Ekstrakt nadzemnog dela je takođe pokazao izraženu redukcionu sposobnost u FRAP ($1347,9 \pm 46,7$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /g) i CUPRAC testu ($466,0 \pm 0,1$ mg troloks ekvivalenata/g) (Radulović i sar., 2012). Značajnu antioksidantnu aktivnost metanolnih ekstrakata nadzemnog i podzemnog dela ove vrste u DPPH ($\text{IC}_{50}=14,1$ i $\text{IC}_{50}=5,5$ $\mu\text{g/mL}$), ABTS ($\text{IC}_{50}=21,2$ i $\text{IC}_{50}=4,7$ $\mu\text{g/mL}$) i FRAP testu ($2419,8$ i $2566,4$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /mg) uvrđili su Sharopov i sar. (2017).

Vodenoetanolni ekstrakt lista *G. robertianum* ispoljio je značajnu sposobnost neutralizacije DPPH ($8,11 \pm 0,27$ $\mu\text{mol DPPH}/\mu\text{mol fenola}$) i ABTS^{•+} radikala ($4,87 \pm 0,17$ $\mu\text{mol L-askorbinska kiselina ekvivalenata}/\mu\text{mol fenola}$) (Amaral i sar., 2009). Vodeni ekstrakti lista ove biljke prečišćeni procesom ultrafiltracije, takođe su ispoljili antioksidantnu aktivnost u DPPH ($464,40$ i $216,39$ $\mu\text{mol troloks ekvivalenata/g}$) i ABTS testovima ($2609,00$ i $1286,96$ $\mu\text{mol troloks ekvivalenata/g}$) (Neagu i sar., 2010; Neagu i sar., 2017). Vodeni ekstrakt nadzemnog dela *G. robertianum* prečišćen procesom nanofiltracije pokazao je veću sposobnost neutralizacije DPPH radikala u poređenju sa troloksom ($92,9\%$ DPPH radikala neutralisano) (Paun i sar., 2011). Antioksidantna aktivnost acetonskih, metanolnih i vodenih ekstrakata nadzemnog dela *G. robertianum* uvrđena je u DPPH ($\text{EC}_{50}=54-65$ $\mu\text{g/mL}$), fericijanid ($\text{EC}_{50}=40,4-61$ $\mu\text{g/mL}$), β -karoten/linolna kiselina testu ($110-145$ $\mu\text{g/mL}$) i TBARS testu ($0,36-7,3$ $\mu\text{g/mL}$) (Graça i sar., 2016a). Dekokti listova i stabljika su pored neutralizacije DPPH ($\text{IC}_{50}=7,6 \pm 0,6$ i $\text{IC}_{50}=17,3 \pm 0,3$ $\mu\text{g/mL}$), ABTS ($\text{IC}_{50}=3,9 \pm 0,6$ i $\text{IC}_{50}=5,8 \pm 0,5$ $\mu\text{g/mL}$) i hidroksi radikala ($\text{IC}_{50}=45,1 \pm 2,4$ i $\text{IC}_{50}=59,8 \pm 8,4$ $\mu\text{g/mL}$), ispoljili i inhibitorno delovanje na lipidnu peroksidaciju u TBARS testu ($\text{IC}_{50}=115,8 \pm 16,1$ i $\text{IC}_{50}=210,4 \pm 38,6$ $\mu\text{g/mL}$) i visok redukcionni potencijal u FRAP testu ($\text{IC}_{50}=63,3 \pm 5,4$ i $\text{IC}_{50}=93,5 \pm 5,5$ $\mu\text{g/mL}$) (Catarino i sar., 2017). Dalje, metanolni ekstrakt nadzemnog dela ove vrste pokazao je izraženije antioksidantno delovanje u β -karoten/linolna kiselina testu ($\text{IC}_{50}=6,8 \pm 1,32$ $\mu\text{g/mL}$) u poređenju sa sintetskim antioksidansom butilhidroksitoluenom (BHT) ($\text{IC}_{50}=85 \pm 0,11$ $\mu\text{g/mL}$). Isti ekstrakt ispoljio je snažniju

redukujuću sposobnost ($IC_{50}=20\pm 4,53 \mu\text{g/mL}$) u testu po Oyaizu (1986) u poređenju sa askorbinskom kiselinom ($IC_{50}=40\pm 1,31 \mu\text{g/mL}$) (Ben Jemia i sar., 2013).

Metanolni ekstrakt korena *G. sanguineum* je ispoljio snažnu antioksidantnu aktivnost u DPPH testu ($IC_{50}=13,86\pm 0,84 \mu\text{g/mL}$), β -karoten-linolna kiselina testu (inhibicija stvaranja hidroperoksida i isparljivih organskih jedinjenja od 88-89%) i testu neutralizacije superoksidnog anjona ($IC_{50}=26,0 \mu\text{g/mL}$) (Sokmen i sar., 2005). Polifenolni kompleks *G. sanguineum* je ispoljio naglašenu Fe^{2+} helirajuću aktivnost (Pavlova i sar., 2019).

Vodeni i metanolni ekstrakti nadzemnog dela *G. pyrenaicum* ispoljili su visok redukcionu kapacitet u FRAP ($364,10\pm 1,71$ i $294,54\pm 4,00$ mg troloks ekvivalenata/g) i CUPRAC ($613,27\pm 4,64$ i $514,79\pm 15,17$ mg troloks ekvivalenata/g) testu, visok potencijal uklanjanja radikala u ABTS ($469,82\pm 0,34$ i $448,84\pm 3,67$ mg troloks ekvivalenata/g) i DPPH ($191,20\pm 0,18$ i $199,26\pm 0,13$ mg troloks ekvivalenata/g) testu kao i sposobnost heliranja metala i visok ukupan antioksidantni kapacitet ($52,39\pm 0,15$ i $36,53\pm 1,10$ mg EDTA ekvivalenata/g) (Świątek i sar., 2021).

Metanolni ekstrakti nadzemnih delova *G. lucidum* i *G. columbinum* pokazali su manju sposobnost neutralizacije DPPH radikala ($IC_{50}>50 \mu\text{g/mL}$) u poređenju sa ekstraktima *G. macrorrhizum*, *G. sanguineum*, *G. pyrenaicum* i *G. robertianum* ($IC_{50}=10,58$, $IC_{50}=11,93$, $IC_{50}=13,61$ i $IC_{50}=14,93 \mu\text{g/mL}$, redom) (Wafa i sar., 2017; Nikolova i sar., 2010). Sa druge strane, Wafa i sar. (2017) su u istom testu utvrdili snažnu antiradikalnu aktivnost metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *G. lucidum* ($IC_{50}=1,86\pm 0,22 \mu\text{g/mL}$).

Vodeni ekstrakt nadzemnog dela *G. palustre* je takođe ispoljio anti-DPPH delovanje ($IC_{50}=5,80 \mu\text{g/mL}$) (Khavrona i sar., 2018).

G. phaeum je vrsta koja do sada nije ispitana u pogledu antioksidantnog delovanja, dok za ostale ispitivane vrste, osim za *G. macrorrhizum* i *G. sanguineum*, ne postoje podaci o antioksidantnoj aktivnosti podzemnih organa.

Pored toga, do sada nije sprovedeno ispitivanje antioksidantne aktivnosti ovih biljaka u biološki relevantnoj sredini (serum) čime se obezbeđuju verodostojnije informacije o njihovoj potencijalnoj terapijskoj primeni.

6.2. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost pojedinih vrsta roda *Geranium* ispitivana je *in vitro*, pre svega prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama i gljivicama, primenom disk difuzione ili mikrodilucione metode. Za procenu rezultata dobijenih u ispitivanjima antimikrobne aktivnosti Alves i sar. (2000) navode da se kod disk difuzione metode aktivnim i veoma aktivnim smatraju uzorci sa zonom inhibicije od 13-18 mm, odnosno zonom većom od 18 mm. U mikrodilucionoj metodi, smatra se da uzorci sa minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIK) manjim od $100 \mu\text{g/mL}$ poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost (Rios i Recio, 2005).

U dosadašnjim ispitivanjima, metanolni ekstrakti lista i rizoma *G. macrorrhizum* ispoljili su inhibitornu aktivnost prema različitim bakterijama i gljivicama *Candida albicans* i *Aspergillus niger* (MIK= $15,6$ - $500 \mu\text{g/mL}$ za ekstrakt listova i MIK= $15,6$ - $5000 \mu\text{g/mL}$ za ekstrakt rizoma). Najbolju aktivnost ekstrakt lista pokazao je prema *Staphylococcus aureus*, a ekstrakt rizoma prema *Bacillus subtilis* (Radulović i sar., 2012). Etanolni ekstrakti herbe i korena *G. pyrenaicum* pokazali su sličnu aktivnost (MIK= 8 - $128 \mu\text{g/mL}$), pri čemu su pored *S. aureus*, najosetljiviji bili sojevi vrsta *Enterococcus faecalis*, *C. albicans* i *Candida parapsilosis* (Özçelik i sar., 2010).

Vodeni ekstrakt cele biljke *G. robertianum* bio je aktivan prema *Streptococcus mutans* (MIK= $12,99 \mu\text{g/mL}$) i *Streptococcus sobrinus* (MIK= $19,70 \mu\text{g/mL}$) (Lima, 2009).

Metanolni ekstrakt nadzemnog dela *G. lucidum* ispoljio je antimikrobnu aktivnost u disk difuzionom testu na *S. aureus* (zona inhibicije $16,37\pm 0,22$ mm) i *B. subtilis* (zona inhibicije $13,51\pm 0,10$ mm) (Wafa i sar., 2017).

Različiti ekstrakti cveta *G. sanguineum* ispoljili su najveću aktivnost prema Gram-negativnoj bakteriji *Agrobacterium vitis* (MIK i MBK 0,25-2,0 mg/mL) (Hammami i sar., 2011).

Zabeležena je i značajna antibakterijska aktivnost vodenog ekstrakta nadzemnog dela *G. palustre* protiv različitih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija primenom agar difuzione metode (zona inhibicije 12-22 mm) (Khavrona i sar., 2018).

U literaturi postoje i podaci o antimikrobnom delovanju etarskih ulja dobijenih iz različitih delova biljaka ovog roda.

Etarska ulja nadzemnog i podzemnog dela *G. macrorrhizum* pokazala su veoma visoku aktivnost prema *B. subtilis* disk difuzionog (zone inhibicije od 33 i 38 mm) i bujon mikrodilucionog tests (MIK=1,0 i MIK=0,4 µg/mL, redom) (Radulović i sar., 2010; Radulović i sar., 2014).

Etarska ulja nadzemnog i podzemnog dela *G. robertianum* ispoljila su aktivnost prema kliničkom izolatu *Escherichia coli* (MIK=0,312 i MIK=0,156 mg/mL, MBK=0,312 i MBK=0,625 mg/mL) i gljivici *Aspergillus fumigatus* (MIK=MBK=0,312 mg/mL) (Radulović i sar., 2012).

Za etarsko ulje dobijeno iz cele biljke *G. sanguineum* takođe je zabeležen efekat prema gljivici *A. fumigatus*, kao i prema bakteriji *Micrococcus flavus* (MIK=MBK=0,312 mg/mL). Slična aktivnost ovog ulja uočena je prema kliničkom izolatu *E. coli* (MIK=0,312 mg/mL, MBK=0,625 mg/mL) (Radulović i sar., 2012). Takođe, etarsko ulje nadzemnog dela ispoljilo je slabu antimikrobnu aktivnost prema *Mycobacterium smegmatis* (MIK=1887 µg/µL), *C. albicans* (MIK=3775 µg/mL), *Saccharomyces cerevisiae* (MIK=3775 µg/mL) i *Bacillus cereus* (MIK=3775 µg/mL) (Renda i sar., 2016).

Etarsko ulje izolovano iz cele biljke *G. lucidum* ispoljilo je aktivnost prema bakterijama *P. aeruginosa* (MIK=MBK=0,837 mg/mL) i kliničkom izolatu *Klebsiella pneumoniae* (MIK=0,837 mg/mL, MBK=1,675 mg/mL) (Radulović i sar., 2011).

I etarsko ulje podzemnog dela *G. columbinum* pokazalo je inhibitorno delovanje prema kliničkom izolatu *K. pneumoniae* (MIK=0,75 mg/mL). Sa druge strane, etarsko ulje nadzemnog dela ove biljke pokazalo je najveću inhibitornu aktivnost prema *Clostridium perfringens* (MIK=0,437 mg/mL), kao i prema *Pseudomonas aeruginosa* i kliničkom izolatu *E. coli* (MIK=0,875 mg/mL) (Radulović i sar., 2011).

Etarsko ulje nadzemnog dela *G. pyrenaicum* ispoljilo je slabu aktivnost prema *S. aureus* (MIK=335 µg/mL), *B. cereus* (MIK=167 µg/mL), *Mycobacterium smegmatis* (MIK=335 µg/mL) i *C. albicans* (MIK=335 µg/mL) (Renda i sar., 2016).

Antivirusno delovanje biljaka roda *Geranium* ispitivano je u vrlo malom broju studija. Vodeni ekstrakt korena *G. sanguineum* ispoljio je značajnu inhibitornu aktivnost na replikaciju *Herpes simplex* virusa tip 1 i 2 (EC₅₀=3,6-6,2 µg/mL) (Serkedjjeva i sar., 1998). Polifenolni kompleks izolovan iz korena ove vrste je pokazao aktivnost protiv influenza A virusa u koncentracijama većim od 200 µg/mL (Serkedjjeva i Hay, 1998a).

Geranium phaeum je vrsta za koju do sada ne postoje podaci o antimikrobnom delovanju, dok se za *G. columbinum* navodi antimikrobna aktivnost etarskog ulja, ali ne i ekstrakata podzemnih i nadzemnih organa. Takođe, za većinu ispitivanih vrsta ne postoje podaci o antimikrobnom delovanju podzemnih organa sa izuzetkom *G. macrorrhizum* i *G. pyrenaicum*.

6.3. Citotoksična aktivnost

Citotoksična aktivnost ekstrakata biljaka roda *Geranium* ispitivana je prema različitim ćelijskim linijama upotrebom kolorimetrijskih testova, MTT testom (engl. *Microculture tetrazolium test*) i sulforodamin B testom.

U ispitivanju Sharopova i saradnika (2017) u MTT testu zabeleženo je citotoksično delovanje metanolnih ekstrakata lista i korena *G. macrorrhizum* na ćelije humane leukemije

CCRF-CEM ($IC_{50}=22,4$ i $IC_{50}=112,3$ $\mu\text{g/mL}$, redom) i CEM/ADR 5000 ($IC_{50}=98,3$ i $IC_{50}=154,2$ $\mu\text{g/mL}$, redom).

Citotoksična aktivnost vodenog ekstrakta lista *G. robertianum* prečišćenog procesom ultrafiltracije utvrđena je na ćelijama karcinoma larinksa (Hep-2) u MTT testu. Uočeno je dozno i vremenski zavisno smanjenje vijabilnosti ćelija karcinoma (procenat ćelijske vijabilnosti 60,0-2,8%) u prisustvu ekstrakta (100-2000 $\mu\text{g/mL}$) (Neagu i sar., 2017). Takođe, nepolarni i vodeni ekstrakti cele biljke pokazali su određenu aktivnost prema ćelijskim linijama karcinoma dojke (MCF-7), pluća (NCI-H460), grlića materice (HeLa) i hepatocelularnog karcinoma (HepG2). Acetonski ekstrakt ispoljio je ujednačeno citotoksično delovanje prema svim ćelijama karcinoma ($IC_{50}=59-71$ $\mu\text{g/mL}$) pri čemu su ćelije karcinoma grlića materice bile najosetljivije. Infuz i dekokt pokazali su veću aktivnost prema ćelijama hepatocelularnog ($IC_{50}=45,68$ $\mu\text{g/mL}$ i $IC_{50}=52,2$ $\mu\text{g/mL}$, redom) i karcinoma dojke ($IC_{50}=74$ $\mu\text{g/mL}$ i $IC_{50}=64$ $\mu\text{g/mL}$, redom) (Graća i sar., 2016a).

Świątek i saradnici (2021) ispitivali su citotoksični potencijal različitih ekstrakata nadzemnog dela *G. pyrenaicum* prema ćelijama karcinoma hipofarinksa (FaDu), karcinoma grlića materice (HeLa) i karcinoma kolona (RKO) u MTT testu. Za etilacetatni ekstrakt zabeležene su niske IC_{50} vrednosti ($IC_{50}=32,34-39,49$ $\mu\text{g/mL}$), ali i niska selektivnost u odnosu na zdrave ćelije. Sa druge strane, polarniji ekstrakti pokazali su selektivnije delovanje prema ćelijama kancera. Vodeni ekstrakt pokazao je citotoksično delovanje prema ćelijama karcinoma hipofarinksa ($IC_{50}=40,22$ $\mu\text{g/mL}$) i najveću selektivnost (Świątek i sar., 2021).

Od osam vrsta ispitivanih u okviru ove doktorske disertacije, postoje podaci o citotoksičnoj aktivnosti tri vrste, *G. macrorrhizum*, *G. robertianum* i *G. pyrenaicum*, dok ostale do sada nisu ispitane.

6.4. Antiinflamatorna aktivnost

U pogledu testiranja antiinflamatornog potencijala ispitivanih vrsta roda *Geranium*, u literaturi postoje podaci o aktivnosti ekstrakata *G. robertianum* i *G. lucidum* u različitim *in vitro* testovima.

Amaral i sar. (2009) su utvrdili sposobnost vodenometanolnog ekstrakta lista *G. robertianum* da neutrališe hipohlorastu kiselinu ($IC_{50}=111,94\pm 2,53$ μM), ali slabiju u poređenju sa kvercetinom kao pozitivnom kontrolom ($IC_{50}=34,22\pm 0,72$ μM). Takođe, utvrđeno je da urolitini, produkti mikrobiotskog metabolizma elagnih tanina prisutnih u *G. robertianum*, poseduju antiinflamatornu aktivnost koja se ogleda u inhibiciji produkcije medijatora inflamacije. Urolitin A (0,625 μM) je potentan inhibitor produkcije TNF- α (29,2 \pm 6,4%), dok urolitin C u istoj koncentraciji sprečava stvaranje IL-6 (13,9 \pm 2,2%) u ćelijskoj liniji THP-1 humanih makrofaga (Piwowarski i sar., 2014).

Catarino i sar. (2017) su ispitivali antiinflamatornu aktivnost dekokta lista i stabljike *G. robertianum* u testovima inhibicije 5-LOX i neutralizacije NO \bullet , kao i u ćelijskom testu u kome se procenjuje sposobnost inhibicije stvaranja NO \bullet radikala i ekspresije iNOS. Oba ekstrakta ispoljila su snažno antiradikalsko delovanje ($IC_{50}=20,0\pm 0,9$ i $IC_{50}=24,2\pm 8,0$ $\mu\text{g/mL}$) protiv NO \bullet radikala, čak deset puta jače od L-askorbinske kiseline ($IC_{50}=285,7\pm 15,4$ $\mu\text{g/mL}$). Sa druge strane ekstrakti nisu imali uticaja na 5-LOX. Za ekstrakt stabljike (100 $\mu\text{g/mL}$) uočena je statistički značajna inhibicija produkcije nitrita (18,7 \pm 1,1 μM), ali ne i uticaj na ekspresiju iNOS (Catarino i sar., 2017).

6.5. Ostale farmakološke aktivnosti

Postoje podaci i o ispitivanju drugih farmakoloških aktivnosti vrsta ovog roda.

U *in vivo* testovima ispitano je hepatoprotektivno delovanje *G. macrorrhizum* i antidijabetično delovanje *G. robertianum* (Radulović i sar., 2012; Ferreira i sar., 2010). Antiulkusna aktivnost *G. robertianum*, hipoglikemijska aktivnost *G. pyreanicum*, antiesterazna aktivnost obe vrste, kao i imunomodulatorna aktivnost *G. sanguineum* procenjene su u *in vitro* testovima (Paun i sar., 2014; Lima, 2009; Świątek i sar., 2021; Georgiev i sar., 2022).

Hepatoprotektivna aktivnost metanolnih ekstrakata nadzemnog i podzemnog dela *G. macrorrhizum* ispitana je *in vivo* u animalnom modelu ugljen-tetrahloridom indukovane hepatotoksičnosti. Intraperitonealna primena ekstrakata u dozi od 120-480 mg/kg dovela je do dozno zavisnog smanjenja nivoa enzima jetre (AST, ALT, γ -GT, PCHE) i ukupnih bilirubina što ukazuje na pozitivne efekte ekstrakata na smanjenje oštećenja jetre. Navedeni efekti su u skladu sa histološkom analizom koja pokazuje normalizaciju strukture i funkcije hepatocita u slučaju primene ekstrakata (Radulović i sar., 2012).

Ferreira i sar. (2010) ispitali su antidijabetično delovanje dekokta lista *G. robertianum* na dijabetičnim pacovima. Utvrđeno je da oralna primena dekokta jačine 1:8 u dozi od 29 ml dnevno dovodi do značajnog smanjenja glikemije od 35% u poređenju sa kontrolnom grupom.

Vodeni ekstrakt *G. robertianum* prečišćen procesom ultrafiltracije u visokom procentu (~92%) je inhibirao ureazu, enzim iz grupe proteaza koju produkuje *Helicobacter pylori* i koji ima značajnu ulogu u razvoju ulkusa. S druge strane, u manjem procentu (~50%) ekstrakt je inhibirao aktivnost α -himotripsina (<54%) koji ima ulogu u razgradnji proteina i polipeptida (Paun i sar., 2014).

Lima (2009) navodi inhibitorno delovanje dekokta cele biljke *G. robertianum* na acetilholin-esterazu (IC₅₀ 765,88 μ g/mL) i potencijalnu primenu u terapiji Alchajmerove bolesti. Slično tome, Świątek i sar. (2021) navode visoku anti-AChE (4,49 mg galantamin ekvivalenata/g) i anti-BChE aktivnost (12,26 mg galantamin ekvivalenata/g) etilacetatnog ekstrakta nadzemnih delova *G. pyreanicum*. Isti ekstrakt inhibirao je aktivnost α -amilaze (1,04 mmol akarboza ekvivalenata/g), dok je metanolni ekstrakt smanjio aktivnost α -glukozidaze (2,04 mmol akarboza ekvivalenata/g). Inhibicija navedenih enzima usporava razgradnju ugljenih hidrata u tankom crevu i posledično smanjuje nivo glukoze u krvi nakon obroka što je značajno sa aspekta kontrole glikemije kod pacijenata sa tip 2 dijabetesom.

Metanolni ekstrakt herbe *G. robertianum* inhibirao je tirozinazu (121,42 mg ekvivalenata kojične kiseline/g) što ukazuje na potencijalnu primenu u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima za zaštitu kože i prevenciju hiperpigmentacije (Świątek i sar., 2021).

Georgiev i sar. (2022) ispitivali su imunomodulatorno delovanje polisaharidnog kompleksa listova i korena *G. sanguineum ex vivo* u humanim leukocitima nakon inflamacije. Utvrđeno je da oba ekstrakta dovode do povećanja broja monocita i granulocita, s tim da polisaharidni kompleks korena uzrokuje i porast broja T i B limfocita, a takođe utiče i na produkciju NO i IL-6 u većoj meri u odnosu na polisaharidni kompleks listova (Georgiev i sar., 2022).

CILJ

Vrste roda *Geranium* imaju značajnu etnomedicinsku primenu i veoma su cenjene u tradicionalnoj medicini na Balkanu. U spontanjoj flori Republike Srbije rastu 23 vrste roda *Geranium*, od kojih je značajan broj zastupljen na Vlasinskoj visoravni i okolini.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje podzemnih i nadzemnih delova osam samoniklih biljnih vrsta roda *Geranium*, sakupljenih na Vlasinskoj visoravni (jugoistočna Srbija), i to: *G. macrorrhizum*, *G. robertianum*, *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. sanguineum*, *G. columbinum*, *G. pyrenaicum* i *G. lucidum* u pogledu:

1. Hemijske karakterizacije ispitivanih vrsta:

- utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava isparljivih frakcija podzemnih i nadzemnih delova
- utvrđivanja hemijskog profila ekstrakata podzemnih i nadzemnih delova i određivanja sadržaja najznačajnijih sekundarnih metabolita i
- izolovanja i određivanja strukture određenih sastojaka ekstrakata.

2. Skrininga farmakoloških aktivnosti ispitivanih vrsta, i to ispitivanjem:

- antioksidantnog potencijala
- antimikrobne aktivnosti i
- citotoksične aktivnosti.

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava i farmakoloških aktivnosti navedenih *Geranium* vrsta ukazaće na mogućnosti njihove primene i daljih istraživanja ovih biljaka kao potencijalno novih lekovitih biljnih sirovina.

MATERIJAL I METODE

1. Biljni materijal

Podzemni i nadzemni organi (herba) osam vrsta roda *Geranium* sakupljeni su u periodu cvetanja na prirodnim staništima na Vlasinskoj visoravni (jugoistočna Srbija).

Biljni materijal su identifikovali prof. dr Branislava Lakušić (Katedra za Botaniku, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet) i prof. dr Bojan Zlatković (Katedra za Biologiju i ekologiju, Univerzitet u Nišu - Prirodno-matematički fakultet). Herbarijumski primerci deponovani su u Herbarijumu Katedre za Biologiju i ekologiju, Univerzitet u Nišu - Prirodno-matematički fakultet (*Herbarium Moesiacum Niš*, HMN) i Herbarijumu Katedre za Botaniku, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet (HFF).

Biljni materijal je osušen na senovitom, provetrenom mestu, na sobnoj temperaturi, i čuvan na hladnom i tamnom mestu do destilacije, odnosno ekstrakcije.

Podaci o sakupljenom biljnom materijalu sa datumima, lokalitetima sakupljanja, tipom podloge i staništa, kao i kolektorskim brojevima prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Podaci o sakupljenom biljnom materijalu

Vrsta (kolektorski broj)	Lokalitet	Datum	Nad. visina (m)	Geografska širina	Geografska dužina	Podloga	Stanište
<i>G. palustre</i> (HMN 13964)	Vlasina Rid, Dojčinova mahala	27.06.2017.	1251	42°45'44.34"N	22°18'42.33"E	škriljci	vlažna, močvarna mesta
<i>G. robertianum</i> (HMN 13965)	Jabukovik, Sastav Reka	08.06.2017.	554	42°54'41.04"N	22°20'48.47"E	škriljci	stene u bukovoju šumi
<i>G. pyrenaicum</i> (HMN 13966)	Crna Trava, Rakinci	08.06.2017.	1205	42°46'43.77"N	22°18'48.87"E	škriljci	planinski pašnjaci i livade
<i>G. columbinum</i> (HMN 13967)	Jabukovik, Sastav Reka	08.06.2017.	554	42°54'41.04"N	22°20'48.47"E	škriljci	livade, pored puteva
<i>G. phaeum</i> (HMN 13968)	Vlasina Rid, Velkova mahala	08.06.2017.	1233	42°44'39.77"N	22°19'34.29"E	škriljci	bukova šuma
<i>G. macrorrhizum</i> (HMN 13969)	Crna Trava, Pudine	08.06.2017.	963	42°49'41.01"N	22°17'26.43"E	škriljci	stene u bukovoju šumi
<i>G. sanguineum</i> (HMN 13970)	Okruglica, dolina Dejanove reke	27.06.2017.	1155	42°38'9.91"N	22°22'49.87"E	škriljci	šumske padine u brezovoj šumi
<i>G. lucidum</i> (HMN 13971)	Jabukovik, Sastav Reka	08.06.2017.	552	42°54'40.21"N	22°20'46.85"E	škriljci	vlažna mesta u bukovoj šumi

2. Izolovanje i analiza hemijskog sastava isparljivih frakcija

2.1. Izolovanje isparljivih frakcija

Za izolovanje isparljivih jedinjenja biljni materijal je neposredno pre destilacije usitnjen do konzistencije praška. Isparljive frakcije podzemnih i nadzemnih delova odabranih vrsta roda *Geranium* izolovane su destilacijom vodenom parom u aparaturi po *Clevenger*-u, u skladu sa procedurom Evropske farmakopeje 10.2 uz primenu *n*-heksana kao rastvarača (1 mL), tokom 2,5 h. Nakon izolovanja, isparljive frakcije su čuvane na 4 °C do analize.

2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza isparljivih frakcija

Kvalitativna i kvantitativna analiza isparljivih frakcija podzemnih i nadzemnih delova izvršena je gasnom hromatografijom sa plameno-jonizacionim (FID) i masenim detektorom (MSD), pomoću Agilent 6890N gasnog hromatografa (Agilent Technologies, SAD) i Agilent 5975C MS detektora pri sledećim eksperimentalnim uslovima:

- temperatura *split-splitless* injektora 200 °C;
- kapilarna kolona HP-5MS (Agilent; 30 m × 0,32 mm, debljina filma stacionarne faze 0,25 μm);
- gas nosač: helijum;
- brzina protoka gasa nosača 1,0 mL/min;
- temperaturni program 60-280 °C sa promenom od 3 °C/min i zadržavanjem krajnje temperature tokom 5 min;
- temperatura transfer linije od 300 °C za FID i 250 °C za MS detektor;
- energija elektronske jonizacije 70 eV;
- zapremina injektovanog uzorka 1 μL u *split* modu (1:10).

Identifikacija komponenata isparljivih frakcija izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena (R_t), linearnih retencionih indeksa (RI) i masenih spektara sa odgovarajućim podacima za referentne supstance i/ili jedinjenja iz kompjuterske datoteke (Wiley 8th Edition, NIST/NBS 05), literature (Adams, 2007; Zhao Zeng i sar., 2007; Custers, 2009; Cardeal i sar., 2006; Kukić i sar., 2006; Stojanović i sar., 2000; Lazari i sar., 2000; Leffingwell i Alford, 2005; Jerković i sar., 2010; Andriamaharavo, 2014; Zhao i sar., 2006; Zaikin i Borisov, 2002; Ruther i sar., 1998; Flamini i sar., 2006; Radulović i sar., 2010). Linearni retencioni indeksi određeni su u odnosu na homologi niz *n*-alkana (C_8 - C_{40}) (Fluka, Švajcarska) analiziranih pod identičnim hromatografskim uslovima (Van den Dool and Kratz, 1963).

Procentualni sadržaj komponenata određen je metodom normalizacije integrisanih površina pikova detektovanih pomoću FID detektora.

Statistička klaster analiza

Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize sastava isparljivih frakcija ispitivanih biljaka statistički su obrađeni primenom UPGMA (eng. *Unweighted Pair-Group Arithmetic Averages clustering*) metode hijerarhijske klaster analize, tj. metode spajanja na osnovu *Pearson*-ovih distanci, pomoću softvera Statistica 5.1. (*StatSoft Inc.*).

UPGMA je metoda multivarijantne klaster analize koja grupiše objekte na osnovu njihovih sličnosti ili razlika i čiji rezultat je grafički prikaz – dendrogram, koji na osnovu razdaljine između pojedinih uzoraka prikazuje ukupnu sličnost ili razlike između njih (Marčetić, 2014). Klaster analiza je obuhvatila sve komponente isparljivih frakcija i njihove relativne procenete.

3. Priprema metanolnih ekstrakata

Osušeni podzemni i nadzemni organi (herba) ispitivanih vrsta roda *Geranium*, najpre su usitnjeni do konzistencije praška i obezmašćeni petroletrom, postupkom maceracije tokom 24 h na sobnoj temperaturi (odnos droga:rastvarač iznosio je 1:6), a potom ekstrahovani metanolom procesom bimaceracije (24 h, odnos droga:rastvarač iznosio je 1:10) uz kontinuirano mešanje na sobnoj temperaturi pomoću KS 15 A šejkera (Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen). Nakon filtriranja, metanol je uklonjen uparavanjem pod sniženim pritiskom pomoću rotacionog vakuum-uparivača (Büchi Rotavapor R-II, Flawil, Švajcarska), a masa dobijenih suvih ekstrakata izmerena i izračunat prinos ekstrakcije (Tabela 4).

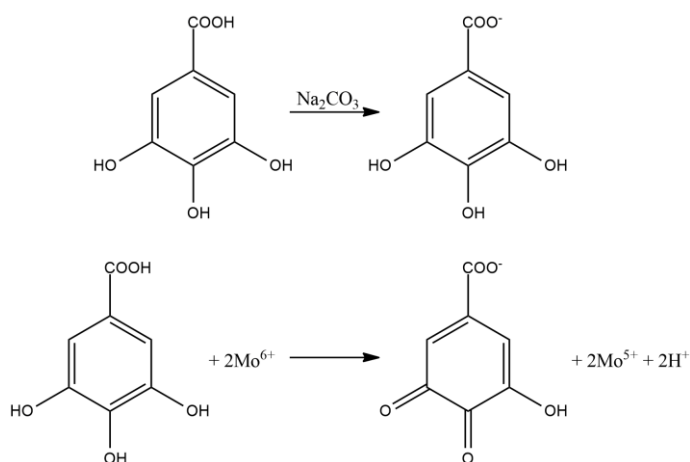
Suvi metanolni ekstrakti čuvani su u zamrzivaču na temperaturi od -18 °C do hemijske analize, odnosno ispitivanja farmakološke aktivnosti.

Tabela 4. Prinos suvih metanolnih ekstrakata ispitivanih *Geranium* vrsta

Vrsta	Prinos (% , m/m)	
	podzemni delovi	nadzemni delovi
<i>G. palustre</i>	28,83	19,13
<i>G. robertianum</i>	4,67	9,54
<i>G. pyrenaicum</i>	20,42	7,20
<i>G. columbinum</i>	4,82	9,08
<i>G. phaeum</i>	17,05	7,37
<i>G. macrorrhizum</i>	25,48	11,95
<i>G. sanguineum</i>	23,94	16,53
<i>G. lucidum</i>	4,20	5,95

4. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina u metanolnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih polifenola u suvim metanolnim ekstraktima podzemnih i nadzemnih delova ispitivanih *Geranium* vrsta određen je spektrofotometrijski na osnovu bojene reakcije sa fosfomolibdovolframovom kiselinom (Folin-Ciocalteu reagens, FC) (Velioglu i sar., 1998). Reakcija se zasniva na redukciji FC reagensa od strane polifenolnih jedinjenja pri čemu nastaje kompleksno jedinjenje plave boje (Slika 19) čija se apsorbancija meri.



Slika 19. Princip reakcije oksidoredukcije galne kiseline i molibdena iz FC reagensa (Martono i sar., 2019)

100 μL metanolnog rastvora suvog ekstrakta (0,2 mg/mL) pomešano je sa 750 μL FC reagensa (Sigma-Aldrich) razblaženog 10 puta. Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi, dodato je 750 μL Na_2CO_3 (60 g/L) i promućkano. Nakon 90 min inkubacije u mraku, izmerena je apsorbancija na 725 nm. Slepna proba je pripremljena na isti način korišćenjem metanola umesto uzorka.

Sadržaj tanina u ispitivanim ekstraktima je određen nakon njihove adsorpcije na kožni prah, prema propisu datom u Ph. Eur. 10. Suvi ekstrakti su najpre rastvoreni u metanolu (0,2 mg/mL), a zatim je u 10 mL rastvora ispitivanog ekstrakta dodato 100 mg kožnog praha. Nakon mešanja tokom 1 sata, smeša je filtrirana i u filtratu je određen sadržaj netaninskih polifenolnih jedinjenja na način koji je prethodno opisan za određivanje sadržaja ukupnih polifenola. Sadržaj tanina je izračunat kao razlika sadržaja ukupnih i netaninskih polifenola.

Sva ispitivanja su rađena u triplikatu, a rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg GAE/g) koristeći kalibracionu krivu galne kiseline (1-10 mg/mL; $y=0,0642x-0,1326$; $R^2=0,9902$).

5. Izolovanje i utvrđivanje strukture sekundarnih metabolita iz metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *G. palustre*

5.1. Izolovanje sekundarnih metabolita

Za izolovanje sekundarnih metabolita iz metanolnog ekstrakta herbe *G. palustre* primenjena je hromatografija u koloni. Kao stacionarne faze korišćeni su adsorbensi: Sefadeks LH-20 (GE Healthcare Bio-Science, Švedska) i oktadecilsilikagel (Sigma-Aldrich, SAD).

Suvi metanolni ekstrakt (1,52 g) suspendovan je u apsolutnom etanolu (3 mL) i razdvajan na stubu Sefadeksa LH-20 (3 \times 24 cm) primenom sledećih eluenata: apsolutni etanol, smeša apsolutnog etanola i 70% acetona (50/50, V/V) i na kraju 70% acetona.

Prikupljeno je 38 frakcija, zapremine 50 mL (A1-A38), a njihov sastav je praćen primenom visokoeфикаsne tečne hromatografije upotrebom Agilent 1100 tečnog hromatografa sa detektorom sa nizom dioda (HPLC-DAD). Razdvajanje je vršeno na Zorbax Sb-C18 koloni (4,6 \times 250 mm, dijametar čestica 5 μm) pri temperaturi kolone od 25 $^\circ\text{C}$. Zapremina injektovanog uzorka iznosila je 20 μL . Binarna mobilna faza sastajala se od 0,33% H_3PO_4 u vodi (A) i

acetonitrila (B). Brzina protoka mobilne faze bila je 0,8 mL/min, uz gradijentni program eluiranja dat u Tabeli 5.

Tabela 5. Program eluiranja (HPLC analiza za praćenje sastava frakcija)

Vreme (min)	% B (acetonitril)
0	8
40	30
50	10

Na osnovu sličnog sastava, frakcije od A22 do A26 su spojene (0,23 g). Deo dobijene frakcije A22-A26 (0,15 g) suspendovan je u apsolutnom etanolu i razdvojen hromatografijom u koloni na stubu oktadecilsilikagela ($1,2 \times 17$ cm) primenom smeše acetonitrila i vode (10/90-50/50, V/V). Prikupljeno je 27 frakcija (B1-B27) zapremine 10 mL, čiji je sastav je praćen primenom HPLC-DAD, sa programom eluiranja datim u Tabeli 5. Iz frakcije B15 dobijeno je 4,5 mg jedinjenja **1** (korilagin), a iz spojenih frakcija B24 i B25 5,4 mg jedinjenja **2** (astragalina-2''-O-galat).

5.2. Utvrđivanje strukture izolovanih sekundarnih metabolita

Za utvrđivanje strukture izolovanih jedinjenja snimljeni su njihovi UV-Vis, ESI-MS i NMR spektri.

UV-Vis i maseni spektri dobijeni su LC-MS analizom korišćenjem Agilent 1260 tečnog hromatografa sa Zorbax Sb-Aq kolonom (3×150 mm, dijametar čestica $3,5 \mu\text{m}$) i mobilne faze koja se sastojala iz smeše 0,1% HCOOH (A) i acetonitrila (B). Brzina protoka mobilne faze bila je 0,35 mL/min. Eluiranje je vršeno na temperaturi od 25°C , a program eluiranja prikazan je u Tabeli 6.

Tabela 6. Program eluiranja (LC-MS analiza izolovanih jedinjenja)

Vreme (min)	% B (acetonitril)
0	10
35	30
45	70
55	10

UV-Vis spektri (oblast 190-640 nm) snimljeni su pomoću G4212B PDA detektora (detektora sa nizom fotodioda), dok je za snimanje ESI-masениh spektara korišćen jednostruki kvadrupol maseni detektor Agilent 6130. Opseg masa je podešen na 100-1200 m/z , a elektrosprej jonizacija u negativnom modu odvijala se u sledećim uslovima: protok gasa za sušenje 9 L/min (N_2), pritisak raspršivača 40 psig, temperatura gasa za sušenje 350°C , napon kapilare 3500 V i napon fragmentatora 70, 100, 200 i/ili 250 V.

Jednodimenzionalni (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 101 MHz) i dvodimenzionalni (COSY; HSQC; HMBC) NMR spektri dobijeni su upotrebom Bruker AscendTM 400 uređaja. Neposredno pre snimanja, uzorci su rastvoreni u deuterisanom metanolu ($\text{MeOH-}d_4$). Hemijska pomeranja (δ) izražena su u ppm, a konstanta sprežanja (J) u Hz. Kao interni standard korišćen je tetrametilsilan ($\delta=0$ ppm).

6. Analiza hemijskog sastava metanolnih ekstrakata

Kvalitativni i kvantitativni sastav metanolnih ekstrakata podzemnih i nadzemih delova ispitivanih vrsta utvrđen je primenom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS).

Priprema uzorka za analizu

Ispitivani, suvi metanolni ekstrakti su neposredno pre analize rastvoreni u metanolu (u koncentraciji 5 mg/mL) i profiltrirani kroz membranski filter (0,45 µm) (Econofilter, Agilent Technologies, Nemačka).

Uslovi izvođenja LC-MS analize

Analiza je izvršena pomoću Agilent 1260 tečnog hromatografa sa kvadrupol masenim detektorom Agilent 6130 i PDA detektorom (G4212B). Parametri masenog detektora bili su isti kao u postupku snimanja MS spektara izolovanih jedinjenja (navedeni su u prethodnom odeljku). Razdvajanje je vršeno na Zorbax Sb-Aq koloni (3 × 150 mm, dijametar čestica 3,5 µm) pri temperaturi kolone od 25 °C. Zapremina injektovanog uzorka je iznosila 5 µL. Binarna mobilna faza sastajala se od 0,1% HCOOH (A) i acetonitrila (B). Program eluiranja prikazan je u Tabeli 6.

Identifikacija sekundarnih metabolita

Identifikacija razdvojenih sekundarnih metabolita u ispitivanim ekstraktima izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena, UV-Vis i masenih spektara sa odgovarajućim podacima dobijenih analizom poredbenih supstanci (komercijalni standardi i izolovana jedinjenja čija je struktura prethodno utvrđena) pod istim hromatografskim uslovima, kao i sa odgovarajućim literaturnim spektralnim podacima (Catarino i sar., 2017; Clifford i sar., 2007; Świątek i sar., 2021; Balázs i sar., 2011; Fang i sar., 2007; Falcão i sar., 2013; Catarino i sar., 2017; Zengin i sar., 2021; Álvarez-Fernández i sar., 2015; Graça i sar., 2017; Tuominen i Salminen, 2017; Wu i sar., 2012).

Određivanje sadržaja sekundarnih metabolita

Kvantitativna LC-MS analiza ispitivanih ekstrakata izvršena je metodom kalibracione krive uz primenu eksternih standarda. Opseg koncentracija poredbenih supstanci za izradu kalibracionih krivih, jednačine kalibracionih krivih, vrednosti koeficijenta korelacije, limita detekcije (eng. *limit of detection*, LOD) i limita kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ) kao i talasne dužine na kojim je merena površina odgovarajućih pikova dati su u Tabeli 7. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) određeni su u skladu sa smernicama Međunarodne konferencije za harmonizaciju (ICH, 2005).

Sadržaj sekundarnih metabolita u metanolnim ekstraktima izražen je u mg/g suvog ekstrakta i predstavlja srednju vrednost 3 ponavljanja.

Tabela 7. Parametri kvantitativne analiza ispitivanih ekstrakata

Poredbena supstanca	Opseg koncentracija za pripremu kalibracione krive	Jednačina kalibracione krive	Koeficijent korelacije	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	Merna talasna dužina
Protokatehinska kiselina	0,002-0,02 mg/mL	$y=37686x+8,0338$	$R^2=0,9996$	0,001	0,002	250 nm
Elagna kiselina	0,007-0,12 mg/mL	$y=138296x-287,46$	$R^2=0,9998$	0,002	0,007	250 nm
Galna kiselina	0,00035-0,5 mg/mL	$y=42795x+163,83$;	$R^2=0,9987$	0,001	0,005	270 nm
Hlorogenska kiselina	0,01-0,1 mg/mL	$y=29141x+17,71$;	$R^2=0,9999$	0,002	0,005	320 nm
Geraniin	0,06-1 mg/mL	$y=19118x-762,48$;	$R^2=0,9977$	0,063	0,192	270 nm
Korilagin	0,04-0,4 mg/mL	$y=13011x-46,677$;	$R^2=0,9995$	0,010	0,031	270 nm
Kvercetin	0,004-0,12 mg/mL	$y=43999x-20,771$;	$R^2=0,9999$	0,002	0,006	350 nm
Kemferol	0,008-0,1 mg/mL	$y=51080x+12,596$;	$R^2=0,9996$	0,001	0,003	350 nm
Astragalin-2''-O-galat	0,012-0,14 mg/mL	$y=13244x-10,974$;	$R^2=1$	0,011	0,032	350 nm

Poredbene supstance

Kao poredbene supstance za identifikaciju i kvantitativnu analizu korišćeni su komercijalni standardi elagne kiseline (Sigma-Aldrich, SAD), galne kiseline (Roth, Nemačka), protokatehinske kiseline (Sigma-Aldrich, SAD), hlorogenske kiseline (Roth, Nemačka), geraniina (Phytolab, Nemačka), kemferola (Fluka, Švajcarska), kvercetina (Sigma-Aldrich, SAD), hiperozida (Roth, Nemačka), izokvercitrina (Sigma-Aldrich, SAD), astragalina (Sigma-Aldrich, SAD), kao i izolovana jedinjenja čija je struktura prethodno utvrđena: telimagrandin I i telimagrandin II iz cvasti *Filipendula vulgaris* (L.) (Samardžić i sar., 2018) i korilagin i astragalin-2''-O-galat izolovani i identifikovani u ovom radu iz metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *G. palustre*, prethodno opisanim postupkom.

Statistička klaster analiza

Rezultati kvalitativne i kvantitativne LC-MS analize hemijskog sastava ispitivanih metanolnih ekstrakata statistički su obrađeni primenom klaster analize UPGMA (*Unweighted Pair-Group Arithmetic Averages clustering*) metode pomoću softvera Statistica 5.1 (*StatSoft Inc.*), na isti način kao i kod klaster analize sastava isparljivih frakcija. Klaster analiza uključivala je sadržaj svih polifenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima.

7. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti metanolnih ekstrakata

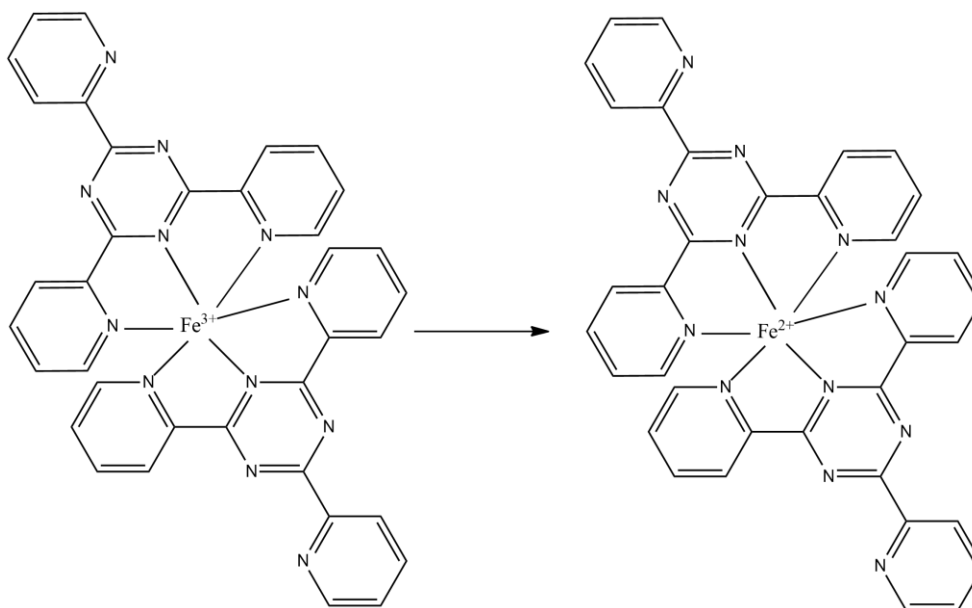
Antioksidantni potencijal metanolnih ekstrakata podzemnih i nadzemnih delova svih ispitivanih *Geranium* vrsta utvrđen je *in vitro* testovima, kao i ispitivanjem njihovog uticaja na parametre oksidativnog stresa u humanom serumu.

Ukupan antioksidantni potencijal ekstrakata procenjen je ispitivanjem njihove sposobnosti da redukuju Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-*s*-triazin kompleks (FRAP test), dok je antiradikalska aktivnost ispitana testom neutralizacije DPPH radikala.

Aktivnost ispitivanih ekstrakata upoređena je sa aktivnošću poznatih antioksidanasa, L-askorbinske kiseline i troloksa (hidrosolubilni ekvivalent vitamina E).

7.1. Ukupna antioksidantna aktivnost (FRAP test)

Ukupna antioksidantna aktivnost, tj. redukciona sposobnost metanolnih ekstrakata procenjena je FRAP testom (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) koji se zasniva na promeni boje: Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-*s*-triazin (Fe^{3+} -TPTZ) kompleks se redukuje do plavo obojenog Fe^{2+} -TPTZ kompleksa (Slika 20) (Luximon-Ramma i sar., 2002; Prior i sar., 2005; Szöllösi i Varga, 2002).



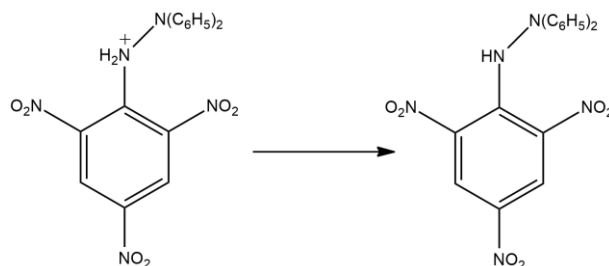
Slika 20. Redukcija Fe^{3+} -TPTZ kompleksa do plavo obojenog Fe^{2+} -TPTZ kompleksa pod uticajem antioksidanasa (Prior i sar., 2005).

FRAP reagens je dobijen mešanjem 25 mL acetatnog pufera (300 mmol/L, pH 3,6) sa 2,5 mL TPTZ rastvora (rastvor 10 mmol/L TPTZ u 40 mmol/L HCl) i 2,5 mL vodenog rastvora FeCl_3 (20 mmol/L). Uzorci su pripremljeni mešanjem 3 mL FRAP reagensa i različitih zapremina (10 μL , 25 μL ili 50 μL) metanolnih rastvora ispitivanih ekstrakata koncentracija 0,5, 1 ili 2 mg/mL, u zavisnosti od samog ekstrakta. Slepna proba i pozitivna kontrola su pripremljene na isti način korišćenjem metanola, odnosno rastvora L-askorbinske kiseline (koncentracije 0,1 mg/mL) umesto rastvora ispitivanog ekstrakta. Nakon inkubacije na 37 °C tokom 30 min, izmerena je apsorbancija na 593 nm. Ispitivanja su vršena u triplikatu, a rezultati su izraženi kao FRAP vrednost koja predstavlja broj mmol Fe^{2+} jona koji ima istu redukcionu sposobnost kao

1 g suvog metanolnog ekstrakta. Ova vrednost dobijena je korišćenjem kalibracione krive ($y=0,864x+0,0165$, $r^2=0,9979$) koja prikazuje zavisnost apsorbancije od koncentracije gvožđe(II)-sulfata (100-1000 $\mu\text{mol/L}$) (Kukić i sar., 2006).

7.2. Test neutralizacije DPPH radikala

DPPH-test se zasniva na redukciji 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, u prisustvu antioksidanasa, do žuto obojenog proizvoda (DPPH-H) čija se apsorbancija meri (Slika 21) (Cuendet i sar., 1997).



Slika 21. Redukcija DPPH radikala pod uticajem antioksidanasa (Popović, 2013)

Različite zapremine rastvora ispitivanih suvih ekstrakata u metanolu (koncentracije 1,0 mg/mL u slučaju ekstrakta nadzemnog dela *G. phaeum* ili 0,5 mg/mL u slučaju ostalih ekstrakata) razblažene su do 2,0 mL metanolom. Nakon dodatka 0,5 mL rastvora DPPH (0,5 mM) uzorci su snažno promućkani i posle 30 min inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, merena je apsorbancija na 517 nm u odnosu na metanol kao slepu probu. Kao pozitivna kontrola korišćena je L-askorbinska kiselina. Ispitivanja su vršena u triplicatu.

Sposobnost neutralizacije DPPH radikala (IC) dobijena je primenom sledeće jednačine:

$$IC_{(\%)} = 100 \times (A_0 - A_S)/A_0, \text{ pri čemu je}$$

A_0 – apsorbancija kontrole,

A_S – apsorbancija analize.

Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrednost – koncentracija ekstrakta/pozitivne kontrole koja neutrališe 50% DPPH radikala i predstavlja srednju vrednost tri određivanja.

7.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa u humanom serumu

Antioksidantna aktivnost metanolnih ekstrakata podzemnih i nadzemnih delova osam ispitivanih vrsta roda *Geranium* procenjena je određivanjem parametara oksidativnog stresa *in vitro* u humanom serumu nakon indukovanja oksidativnog stresa *tert*-butilhidroperoksidom (TBH). Serumski pul je dobijen spajanjem seruma zdravih dobrovoljaca sakupljenih prilikom njihovih redovnih kontrola na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu i uz njihov informisani pristanak za upotrebu seruma u navedene svrhe. U ispitivanju su korišćeni isključivo serumski pulovi sa referentnim osnovnim biohemijskim parametrima. Serumski pul je podeljen, a alikvoti čuvani u zamrzivaču na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ do analize, najduže 2 nedelje.

Priprema uzoraka

Postupak pripreme uzoraka predstavljen je u Tabeli 8. Jednake zapremine (25 μL) rastvora ekstrakta u dimetilsulfoksidu (DMSO) rastućih koncentracija (0,25, 0,5 i 1 mg/mL) i *tert*-butilhidroperoksida (0,25 mmol/L) pomešane su sa 450 μL seruma tako da su koncentracije

uzoraka bile u opsegu 12,5-50 µg/mL. Nakon intenzivnog mešanja na Vortex mešalici, smeša je inkubirana na temperaturi od 37 °C tokom dva sata. Svi uzorci su postavljeni u duplikatu. Troloks (hidrosolubilni ekvivalent vitamina E) korišćen je kao pozitivna kontrola, a slepa proba je pripremljena upotrebom rastvarača (DMSO).

Tabela 8. Priprema uzoraka za određivanje parametara oksidativnog stresa

	Ispitivani uzorak			Kontrolni uzorak
	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL	
Serum	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL
Rastvor ekstrakta u DMSO	25 µL	25 µL	25 µL	-
Rastvarač (DMSO)	-	-	-	25 µL
TBH	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Nakon pripreme uzoraka, pomoću ELISA čitača (Pharmacia LKB, Wien, Austria) spektrofotometrijski, na odgovarajućim talasnim dužinama, određeni su parametri oksidativnog stresa: totalni antioksidantni kapacitet (TAK), totalni oksidantni potencijal (TOP), prooksidantno-antioksidantni balans (PAB) i ukupne sulfhidrilne grupe (SHG).

Totalni antioksidantni kapacitet (TAK)

Određivanje totalnog antioksidantnog kapaciteta ili statusa se zasniva na činjenici da je 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) različite boje u zavisnosti od oksidacionog stanja (Erel, 2004; Kotur-Stevuljević, 2015).

ABTS⁺ katjon je u kiseljoj sredini (acetatni pufer, pH = 3,6) u prisustvu vodonik-peroksida plavozelene (smaragdne) boje za razliku od redukovano oblika koji je bezbojan. Antioksidansi prisutni u uzorku dovode do smanjenja intenziteta boje katjona proporcionalno njihovoj količini u uzorku.

Postupak određivanja TAK prikazan je u Tabeli 9.

Tabela 9. Određivanje totalnog antioksidantnog kapaciteta (TAK)

	Analiza	Standard	Slepa proba
Uzorak ^a	12,5 µL	-	-
Reagens 1 ^b	200 µL	200 µL	200 µL
Reagens 2 ^c	37,5 µL	37,5 µL	37,5 µL
Standard ^d	-	12,5 µL	-
Dejonizovana voda	-	-	12,5 µL

^a Prethodno pripremljeni uzorci (Tabela 8)

^b Acetatni pufer (0,4 mol/L, pH = 5,8)

^c Rastvor ABTS-a: pripremljen je rastvaranjem 0,549 g ABTS-a u 100 mL smeše acetatnog pufera (30 mmol/L, pH = 3,6) i rastvora vodonik-peroksida (2 mmol/L) u odnosu 3:7. Rastvor je inkubiran tokom jednog sata na sobnoj temperaturi pri čemu je došlo do formiranja ABTS⁺ katjona karakteristične smaragdne boje.

^d Rastvor troloksa: pripremljen je rastvaranjem troloksa u fosfatnom puferu (30 mmol/L, pH = 7,4) u rastućim koncentracijama (0,125-2 mmol/L).

Nakon dodavanja reagenasa i inkubacije na sobnoj temperaturi tokom 10 min izmerena je apsorbancija na 660 nm uz dejonizovanu vodu kao slepu probu.

Rezultati su izraženi kao broj mmol troloks ekvivalenata/L na osnovu kalibracione krive ($y=0,0004x + 0,0512$, $R^2=0,9915$) koja prikazuje zavisnost apsorbancije od koncentracije troloksa.

Totalni oksidantni potencijal (TOP)

Određivanje totalnog oksidantnog potencijala ili statusa se zasniva na oksidaciji ferio jona Fe^{2+} -*o*-dianizidinskog kompleksa do ferio jona (Fe^{3+}) pod uticajem oksidanasa (Erel 2005; Kotur-Stevuljević i sar., 2015). Nastali ferio jon sa ksilenol-oranžom u kiseljoj sredini gradi kompleks narandžaste boje. Intenzitet boje srazmeran je količini oksidanasa. Na ovaj način se vrši procena količine ukupnih oksidacionih molekula (vodonik-peroksida i lipidnih hidroperoksida).

Postupak određivanja prikazan je u Tabeli 10. Rezultati su izraženi kao broj $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{L}$ na osnovu kalibracione krive ($y=0,0064x+0,0584$, $R^2=0,9965$) koja prikazuje zavisnost apsorbancije od koncentracije vodonik-peroksida (10-200 $\mu\text{mol/L}$).

Nakon pripreme, uzorci su inkubirani tokom 3-4 min, a zatim je izmerena apsorbancija na 560 nm uz dejonizovanu vodu kao slepu probu.

Tabela 10. Određivanje totalnog oksidantnog potencijala (TOP)

	Analiza	Standard	Slepa proba
Uzorak ^a	35 μL	-	-
Reagens 1 ^b	225 μL	225 μL	225 μL
Reagens 2 ^c	11 μL	11 μL	-
Standard ^d	-	35 μL	-
Dejonizovana voda	-	-	35 μL

^a Prethodno pripremljeni uzorci (Tabela 8)

^b TOS 1: pripremljen rastvaranjem 114 mg ksilenol-oranža i 8,18 g natrijum-hlorida u 900 mL sumporne kiseline (25 mmol/L) i dodavanjem 100 mL glicerola, a pH vrednost je podešena na 1,75

^c TOS 2: pripremljen rastvaranjem 1,96 g gvožđe(II)-amonijumsulfata i 3,17 g *o*-dianizidin-dihidrohlorida u 1000 mL sumporne kiseline (25 mmol/L)

^d Rastvor vodonik-peroksida (10-200 $\mu\text{mol/L}$)

Prooksidantno-antioksidantni balans (PAB)

Ispitivanje prooksidantno-antioksidantnog balansa podrazumeva određivanje količine vodonik-peroksida u prisustvu antioksidanasa i zasniva se na promeni boje 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) u zavisnosti od oksidacionog stanja (Alamdari i sar., 2007; Kotur-Stevuljević i sar., 2015). TMB katjon je plave boje, dok je redukovan, molekulski oblik bezbojan. TMB spontano reaguje sa vodonik-peroksidom i antioksidansima pri čemu je reakcija sa vodonik-peroksidom enzimski katalizovana za razliku od reakcije sa antioksidansima. Intenzitet plave boje TMB^+ katjona proporcionalan je količini oksidanasa u uzorku.

Postupak određivanja prikazan je u Tabeli 11. Rezultati su izraženi kao koncentracija (%) vodonik-peroksida u uzorku, a dobijeni su primenom kalibracione krive ($y=0,015x-0,657$, $R^2=0,993$) konstruisane korišćenjem smeše vodonik-peroksida i mokračne kiseline u različitom odnosu (udeo vodonik-peroksida 0-100%). Vodonik-peroksid i mokračna kiselina su uzeti kao jedinjenja sa oksidantnom, odnosno antioksidantnom aktivnošću koja ne reaguju međusobno, a u reakciju sa hromogenom stupaju nezavisno. Vodonik-peroksid stupa u reakciju oksidacije sa hromogenom u prisustvu enzima peroksidaze pri čemu nastaje plavo obojeni TMB^+ katjon. S druge strane, reakcija između mokračne kiseline i TMB^+ katjona nije enzimski katalizovana.

Tabela 11. Određivanje prooksidantno-antioksidantnog balansa (PAB)

	Analiza	Standard	Slepa proba
Uzorak ^a	10 µL	-	-
Standard ^b	-	10 µL	-
Dejonizovana voda	-	-	10 µL
Radni rastvor ^c	180 µL	180 µL	180 µL
HCl (2 mol/L)	40 µL	40 µL	40 µL

^a Prethodno pripremljeni uzorci (Tabela 8).

^b Standardni rastvor: pripremljen mešanjem vodonik-peroksida (1 mmol/L) i mokraćne kiseline (6 mmol/L) u sledećem odnosu: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 i 100:0.

^c Radni rastvor: pripremljen neposredno pre upotrebe mešanjem 1 mL rastvora TMB⁺ katjona i 10 mL TMB II rastvora.

Rastvor TMB⁺ katjona pripremljen je mešanjem 50 mL acetatnog pufera (0,05 mol/L, pH = 4,5), 1 mL TMB I rastvora i 175 µL rastvora hloramina T (100 mmol/L). Smeša je inkubirana na tamnom mestu na temperaturi od 37 °C tokom jednog sata uz neprekidno mešanje nakon čega je dodat enzim peroksidaza (25U). Rastvor je čuvan u zamrzivaču na -20 °C.

TMB II rastvor pripremljen je rastvaranjem 200 µL TMB I rastvora u 10 mL acetatnog pufera (0,05 mol/L, pH = 5,6). Rastvor je čuvan u frižideru na +4 °C, ne duže od dva dana.

TMB I rastvor pripremljen je rastvaranjem 60 mg TMB u 10 mL dimetilsulfoksida. Rastvor je čuvan u zamrzivaču na -20 °C.

Nakon mešanja ispitivanog uzorka/standardnog rastvora/slepe probe i radnog rastvora vršena je inkubacija na 37 °C. Nakon 10 min reakcija je prekinuta dodavanjem hlorovodonične kiseline i merena je apsorbancija na talasnoj dužini od 450 nm.

Određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih grupa (SHG)

Određivanje sadržaja ukupnih sulfidrilnih grupa se zasniva na reakciji 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzojeve kiseline (DTNB) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini (pH = 9,0), pri čemu nastaje jedan mol p-nitrofenol anjona po jednom molu tiola (Ellman, 1959; Kotur-Stevuljević i sar., 2015). Nastali anjon je žute boje i njegova apsorbancija se meri.

Postupak određivanja prikazan je u Tabeli 12.

Tabela 12. Određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih grupa (SHG)

	Analiza	Standard	Slepa proba
Uzorak ^a	15 µL	-	-
Standard ^b	-	15 µL	-
Dejonizovana voda	-	-	15 µL
Pufer ^c	270 µL	270 µL	270 µL
DTNB ^d	10 µL	10 µL	10 µL

^a Prethodno pripremljeni uzorci (Tabela 8).

^b Vodeni rastvor redukovano glutaciona (0,1-1 mmol/L)

^c Fosfatni pufer (0,2 mol/L, pH = 9,0)

^d Rastvor DTNB (10 mmol/L) u fosfatnom puferu (50 mmol/L, pH = 7,0)

Nakon dodavanja reagenasa i inkubacije smeše tokom 25 min na sobnoj temperaturi u mraku, izmerena je apsorbancija na talasnoj dužini od 412 nm.

Rezultati su izraženi kao broj mmol/L na osnovu jednačine kalibracione krive ($SHG=A*2,45$) konstruisane korišćenjem vodenog rastvora redukovanog glutationa kao standarda.

Oksi skor

Na osnovu dobijenih rezultata za TAK, TOP, PAB i SHG izračunat je oksi skor koji predstavlja razliku između prooksi i antioksi skora. Prooksi i antioksi skor predstavljaju srednju vrednost Z skorova oksidantnih (TOP i PAB) i antioksidantnih (TAK i SHG) parametara. Z skor je računat kao razlika vrednosti dobijene za ispitivane i kontrolne uzorke, podeljena sa standardnom devijacijom kontrolnih uzoraka. S obzirom na to da distribucija parametara nije normalna, rezultati su izraženi u vidu medijana i percentila (25 i 75). Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim za troloks kao poredbenu supstancu.

7.4. Statistička obrada podataka

Statistička analiza je izvršena korišćenjem SPSS 18.0 softvera (SPSS, INC. Chicago, Illinois USA). Da bi se utvrdilo da li postoje statistički značajne razlike u pogledu ukupne antioksidantne i antiradikalske aktivnosti ispitivanih ekstrakata, korišćen je Kruskal-Wallis-ov test sa Bonferroni korekcijom. Vrednosti oksi skorova ispitivanih ekstrakata poređene su Friedman-ovim testom, nakon isključenja uticaja različitih koncentracija. Postojanje statistički značajne razlike prihvaćeno je u slučaju $p < 0,05$.

8. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata

8.1. Testirani mikroorganizmi

Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata podzemnih i nadzemnih organa ispitivanih *Geranium* vrsta testirana je na standardnim sojevima Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) i *Bacillus subtilis* (ATC 6633), Gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) i *Salmonella abony* (NCTC 6017), deset kliničkih izolata *E. coli* i sedam kliničkih izolata *K. pneumoniae*, kao i na standardnom soju gljivice *Candida albicans* (ATCC 10231).

Standardni sojevi mikroorganizama nabavljeni su u liofiliziranoj formi -KWIK-STIK™ od referentnog proizvođača Microbiologics, a klinički izolati iz Kliničkog centra Srbije (KCS) i Kliničko-bolničkog centra (KBC) Zvezdara. Podaci o kliničkim izolatima predstavljeni su u Tabeli 13.

Tabela 13. Poreklo kliničkih izolata *E. coli* i *K. pneumoniae* i demografski podaci o pacijentima.

Soj	Poreklo	Biološki uzorak	Pol	Starost (godine)
<i>E. coli</i>				
1129	KCS	aspirat nazofarinksa	ženski	2
6317	KBC Zvezdara	hemokultura	ženski	65
1566	KCS	bris rane	ženski	26
1511	KCS	bris lohija	ženski	33
7	KCS	bris rane	muški	61
60	KBC Zvezdara	bris rane	ženski	74
2152	KCS	bris lohija	ženski	29
1592	KCS	bris farinksa	muški	1
6992	KBC Zvezdara	aspirat bronha	muški	82
836	KCS	bris farinksa	muški	1
<i>K. pneumoniae</i>				
217	KBC Zvezdara	hemokultura	muški	72
194	KBC Zvezdara	hemokultura	muški	84
6825	KBC Zvezdara	urinokultura	muški	65
447	KBC Zvezdara	peritonealna tečnost	muški	66
5	KCS	hemokultura	muški	42
4	KCS	hemokultura	ženski	58
3	KCS	hemokultura	muški	78

8.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) tj. najniže koncentracije koje inhibiraju vidljiv rast mikroorganizama, utvrđene su bujon mikrodilucionom metodom (CLSI, 2015) uz korišćenje sterilnih mikrotitarskih ploča sa 96 bunarića (Sarstedt AG & Co. KG, Nemačka).

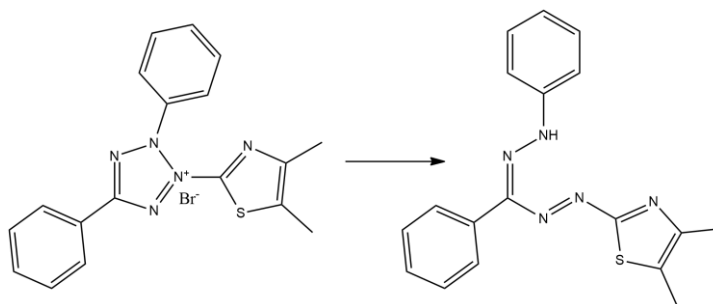
Sveže kulture mikroorganizama pripremljene su inkubacijom na tripton soja agaru (TSA; Torlak, Srbija) tokom 24 h na 37 °C. Nakon toga, pojedinačne kolonije sa čistih kultura suspendovane su u fiziološkom rastvoru do približne gustine od $1,5 \times 10^8$ CFU/mL što je izmereno DEN-1 McFarland denzitometrom (Biosan, Litvanija). Od navedene, početne suspenzije testiranih mikroorganizama, pripremljen je inokulum, tj. radna suspenzija. Suspenzije bakterija su razblažene Müller-Hinton bujonom do reda veličine 2×10^6 CFU/mL, a suspenzija gljivice *C. albicans* Sabouraud dekstroza bujonom do 2×10^5 CFU/mL. Suspenzije su zatim nanete u bunariće u zapremini od 100 μ L. U istoj zapremini, dodata su razblaženja metanolnih rastvora ekstrakata u bujonu, tako da je finalna koncentracija ekstrakata u bunarićima bila u opsegu od 12,5 do 200 μ g/mL. Smeša je inkubirana 24 h na 37 °C za bakterijske sojeve i 48-72 h na 26 °C za *C. albicans*. Nakon toga je izvršeno očitavanje rezultata.

Rezultati su izraženi kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), tj. najmanje koncentracije ispitivanih ekstrakata u kojima nije uočen vidljiv rast mikroorganizama. Kao indikator rasta korišćen je 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolijum-hlorid (TTC; Sigma-Aldrich, SAD) u finalnoj koncentraciji od 0,05%. Ovo jedinjenje se pod uticajem dehidrogenaza bakterijskih ćelija redukuje do 1,3,5-trifenilformazana crvene boje. Crvena boja u bunarćima se tumači kao vidljiv rast bakterija. Sve probe su postavljene u duplikatu, a kao negativna kontrola korišćen je metanol umesto ispitivanih ekstrakata. Kao pozitivna kontrola rasta mikroorganizama, u poslednjim kolonama mikrotitracione ploče, korišćene su suspenzije mikroorganizama u medijumu.

Dobijene vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija ekstrakata upoređene su sa MIK vrednostima dobijenim za standardne antibiotike koji su korišćeni kao pozitivna kontrola: ampicilin, amikacin i vankomicin i antimikotik nistatin (Sigma-Aldrich, SAD).

9. Ispitivanje citotoksične aktivnosti metanolnih ekstrakata

Citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata podzemnih i nadzemnih organa ispitivanih vrsta, kao i geraniina i elagne kiseline testirana je spektrofotometrijski MTT testom (*Microculture Tetrazolium Test*) koji se zasniva na redukciji žute, hidrosolubilne soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromida (MTT reagens) do nerastvornog, ljubičasto obojenog formazana pod uticajem mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze vijabilnih ćelija (Slika 22) (Mosmann, 1983).



Slika 22. Redukcija MTT reagensa do ljubičasto obojenog formazana

Intenzitet ljubičaste boje proporcionalan je broju vijabilnih, metabolički aktivnih ćelija u eksponencijalnoj fazi rasta u ćelijskoj kulturi.

Rezultati su izraženi kao IC₅₀ - koncentracija ekstrakta/jedinjenja koja smanjuje vijabilnost ćelija za 50%. Aktivnost ekstrakata upoređena je sa aktivnošću hemoterapeutika doksorubicina koji je korišćen kao kontrolna supstanca.

9.1. Ćelijske linije

Citotoksična aktivnost testirana je na ćelijskim linijama humanog karcinoma prostate (PC-3), kolona (HT-29), grlića materice (HeLa) i melanoma (Hs 294T). Selektivnost citotoksičnog delovanja utvrđena je ispitivanjem na zdravim ćelijama – humanim fibroblastima pluća (MRC-5).

Ćelijske kulture su gajene u jednom sloju u hranljivom medijumu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, Germany) u koji je dodat 10% fetalni goveđi serum (FBS), L-glutamin (2 mmol/L), penicilin (100 IU/mL) i streptomycin (100 µg/mL). Sve ćelijske linije održavane se u sudovima za kulturu (Thermo Scientific - Nunc & Samco, 25 cm²) na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlage i 5% CO₂ (Heraeus).

S obzirom na to da PC-3, HeLa, HT-29, Hs 294T i MRC-5 ćelije rastu u jednom sloju, neophodno je presađivanje po postizanju konfluencije od 80% do 90%. Jednoćelijske suspenzije su dobijene dodavanjem 0,5% rastvora tripsina i inkubacijom tokom 5 minuta na 37 °C. Enzimski reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma, pri čemu komponente seruma vrše inaktivaciju tripsina. Ćelijska suspenzija je zatim centrifugirana 10 minuta na 1500 o/min, a ćelijski talog resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga određen je broj ćelija i njihova vijabilnost testom odbacivanja boje. U eksperimentima su korišćene ćelije u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja.

9.2. Određivanje broja ćelija i vijabilnosti

U ispitivanju su korišćene isključivo žive, vijabilne ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa tripan plavim (Phillips, 1973). Test se zasniva na činjenici da boja ulazi u ćeliju u slučaju narušenog integriteta membrane te se mrtve ćelije, za razliku od živih boje plavo. Ćelijska suspenzija (50 µL) razblažena je sa 200 µL rastvora tripan plavog (0,5 %) i ćelije su brojane pomoću invertnog mikroskopa sa hemocitometrom. Uzimajući u obzir dimenzije komore i razblaženje, broj ćelija u 1 mL suspenzije dobijen je primenom sledeće jednačine:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 5, \text{ pri čemu je:}$$

N – ukupan broj živih ćelija u 1 mL suspenzije,

N₀ – broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra,

5 – faktor razblaženja i

10⁴ – korekcionni faktor (dubina komore i zapremina u mL).

Vijabilnost ćelija je izračunata prema sledećoj formuli:

$$V(\%) = (N_0 / (N_0 + M_0)) \times 100, \text{ pri čemu je:}$$

M₀ – broj mrtvih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra.

Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90%.

9.3. Tretman ćelijskih linija

Ispitivanje je vršeno u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića (Biologix, China), a sam postupak je predstavljen u Tabeli 14. Devedeset μL medijuma sa 5×10^3 ćelija je posejano u bunariće i ostavljeno na 37°C , sa 5% CO_2 naredna 24 sata. Nakon toga, u bunariće su dodati rastvori ispitivanih ekstrakata/jedinjenja u dimetilsulfoksidu (DMSO) rastućih koncentracija u zapremini od $10 \mu\text{L}$ i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u narednih 48 h. Finalne koncentracije ispitivanih ekstrakata/jedinjenja bile su 1, 10, 25, 50 i $100 \mu\text{g/mL}$. Za pripremu kontrolnih uzoraka i slepe probe, umesto rastvora ispitivanih ekstrakata/jedinjenja, odnosno ćelija, korišćen je medijum.

9.4. Određivanje ćelijskog preživljavanja MTT testom

Nakon 48 h, u bunariće je dodato $10 \mu\text{L}$ MTT reagensa rastvorenog u fosfatnom puferu (koncentracije 5 mg/mL) i nastavljena je inkubacija naredna 3 h pod prethodno navedenim uslovima. Po isteku perioda inkubacije, u svaki bunarić dodato je $100 \mu\text{L}$ rastvora hlorovodonične kiseline u izopropanolu ($0,04 \text{ mol/L}$) kako bi se nastali formazan rastvorio. Ispitivanje je vršeno u četiri ponavljanja.

Apsorbancija je merena na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm . Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

$$\text{CI (\%)} = (1 - A_s/A_k) \times 100, \text{ pri čemu je:}$$

A_k – apsorbancija kontrole

A_s – apsorbancija uzoraka.

Na osnovu dobijenih rezultata, izračunata je IC_{50} koncentracija.

Tabela 14. Ispitivanje citotoksičnosti MTT testom

	Analiza	Kontrola	Slepa proba
Medijum sa ćelijama ^a	$90 \mu\text{L}$	$90 \mu\text{L}$	-
Uzorak ^b	$10 \mu\text{L}$	-	$10 \mu\text{L}$
MTT reagens ^c	$10 \mu\text{L}$	$10 \mu\text{L}$	$10 \mu\text{L}$
Medijum	-	$10 \mu\text{L}$	$90 \mu\text{L}$
HCl u izopropanolu ^d	$100 \mu\text{L}$	$100 \mu\text{L}$	$100 \mu\text{L}$

^a Broj ćelija 5×10^3

^b Rastvor ispitivanog ekstrakta/jedinjenja u DMSO

^c Rastvor MTT u fosfatnom puferu (5 mg/mL)

^d Koncentracije $0,04 \text{ mol/L}$

Kontrola

U ispitivanju su korišćene ćelije u logaritamskoj fazi rasta i u koncentraciji koja je obezbeđivala logaritamski rast ćelija tokom trajanja testa. Vijabilnost posađenih ćelija, određena testom sa tripan plavim, bila je veća od 90%. Koeficijent varijacije u eksperimentalnim i kontrolnim uzorcima je bio manji od 15%, a za najveći deo i manji od 10%. Apsorbancija kontrole bila je bar 3 puta veća od apsorbancije slepe probe.

REZULTATI I DISKUSIJA

1. Hemijski sastav isparljivih frakcija

Kvalitativna i kvantitativna analiza isparljivih frakcija podzemnih i nadzemnih organa osam ispitivanih *Geranium* vrsta, dobijenih destilacijom vodenom parom, izvršena je primenom gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim i masenim detektorom (GC-FID/MS).

Hemijski sastav isparljivih frakcija *G. palustre* i isparljive frakcije podzemnog dela *G. pyrenaicum* ispitani su po prvi put u okviru ovog rada. Takođe, za vrste *G. sanguineum* i *G. columbinum* ne postoje podaci o hemijskom sastavu frakcija dobijenih posebno iz nadzemnih i podzemnih delova.

U ispitivanim uzorcima identifikovano je ukupno 129 jedinjenja (Tabela 15). Broj identifikovanih jedinjenja bio je najniži u isparljivoj frakciji podzemnog dela *G. columbinum* (9), a najveći u frakciji dobijenoj iz nadzemnog dela *G. palustre* (84). Identifikovana jedinjenja činila su preko 95% količine frakcija sa izuzetkom nadzemnog dela *G. lucidum* (84,9%). Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize prikazani su u Tabeli 15.

U zavisnosti od ispitivane vrste kao i od dela biljke, glavne grupe jedinjenja u ispitivanim frakcijama bili su seskviterpeni (29,0-94,6%), diterpeni (41,1-43,0%) i masne kiseline i njihovi derivati (70,3-95,7%). Seskviterpeni su bili dominantni (29,0-94,6%) u isparljivim frakcijama nadzemnih delova svih ispitivanih vrsta osim *G. phaeum* i *G. columbinum*, kao i u isparljivoj frakciji podzemnog dela *G. macrorrhizum* (92,3%). U isparljivim frakcijama podzemnih delova svih ostalih ispitivanih vrsta preovladavale su masne kiseline i njihovi derivati (70,3-95,7%), a kao glavni sastojak izdvojila se heksadekanska kiselina (35,1-79,2%). Isparljive frakcije nadzemnih delova *G. phaeum* i *G. columbinum* bile su bogate diterpenima (41,1 i 43,0%, redom).

Najveći deo isparljive frakcije nadzemnog dela *G. macrorrhizum* činio je germakron (73,3%), a pratio ga je germakren B (8,5%). U isparljivoj frakciji podzemnog dela ove vrste kao glavni sastojak izdvojio se δ -gvajen (α -bulnezen) (76,8%), a u značajnoj količini bio je prisutan i α -gvajen (10,7%). Navedeni rezultati uglavnom su u skladu sa prethodnim ispitivanjima isparljivih frakcija ove vrste (Chalchat i sar., 2002; Radulović i sar., 2010). Iako Radulović i sar. (2010) navode germakron kao drugo najzastupljenije jedinjenje u isparljivoj frakciji podzemnog dela (11,5%), sadržaj ovog jedinjenja u ispitivanom uzorku bio je značajno manji (0,8%). Dobijeni rezultati idu u prilog tvrdnji da se sinteza germakrona pre svega odvija u nadzemnom, a sinteza gvajena u podzemnom delovu biljke (Radulović i sar., 2010).

Seskviterpeni su činili i najveći deo isparljivih frakcija nadzemnih delova *G. sanguineum*, *G. robertianum*, *G. pyrenaicum*, *G. palustre* i *G. lucidum*, iako su heksadekanska kiselina (6,6-21,1%) i fitol (9,9-19,3%) bili među najzastupljenijim jedinjenjima. Od seskviterpena najzastupljenija jedinjenja prisutna u svim navedenim frakcijama bila su (*E*)-kariofilen (3,9-15,7%) i germakren D (3,7-15,4%). Osim njih utvrđeno je i prisustvo heksahidrofarnesilacetona (2,2-4,8%) i kariofilen-oksida (tragovi-10,2%). Treba napomenuti da su se isparljive frakcije *G. sanguineum* i *G. palustre* razlikovale od ostalih ispitivanih po prisustvu β -bisabolena (5,2% i 1,5%, redom). Ovo jedinjenje bilo je još u tragovima prisutno u nadzemnom delu *G. phaeum*. Takođe, isparljiva frakcija *G. palustre* je bila karakteristična po prisustvu β -selinena kao dominantnog jedinjenja (18,6%). Prisustvo ovog seskviterpenskog ugljovodonika nije uočeno ni u jednoj od ispitivanih frakcija osim u frakcijama *G. macrorrhizum*, ali u značajno manjoj količini. U ispitivanju Radulović i sar. (2012) u isparljivoj frakciji cele biljke *G. sanguineum* dominantnu grupu jedinjenja činile su masne kiseline i njihovi derivati (36,6%), a kao glavna

jedinjenja navode se heksadekanska kiselina (9,6%) i heksahidrofarnezilacetone (9,6%), dok su germakren D, (*E*)-kariofilen i β -bisabolen takođe bili prisutni, ali u manjim količinama. U prethodnom ispitivanju (Hammami i sar., 2011), u etarskom ulju izolovanom iz cvetova *G. sanguineum* kao jedan od glavnih sastojaka navodi se linalol (8,4%) koji je takođe prisutan u frakciji nadzemnog dela ove vrste ispitane u ovom radu (2,4%).

Isparljiva frakcija nadzemnog dela *G. robertianum* razlikuje se pre svega u kvantitativnom sastavu u poređenju sa rezultatima prethodnih ispitivanja (Gębarowska i sar., 2017; Pedro i sar., 1992; Radulović i sar., 2012). U etarskim uljima nadzemnog dela ove biljke poreklom iz Poljske i Holandije kao dominantno jedinjenje identifikovan je linalol (13,4% i 22,9%, redom) praćen germakrenom D (8,6%) u ulju poreklom iz Poljske i γ -terpinenom (13,9%) u ulju poreklom iz Holandije. Sadržaj linalola u uzorku ispitivanom u ovom radu bio je niži (5,0%), a dominirali su fitol (19,3%) i heksandekanska kiselina (12,5%). Radulović i sar. (2012) navode masne kiseline i njihove derivate kao dominantne sastojke (49,2%), a heksadekansku kiselinu (16,6%) kao glavno jedinjenje u isparljivoj frakciji dobijenoj iz nadzemnog dela *G. robertianum* sa Suve Planine. Sa druge strane, sadržaj fitola u prethodnim studijama bio je znatno niži (0,3-3,8%) (Gębarowska i sar., 2017; Pedro i sar., 1992; Radulović i sar., 2012).

Veći deo isparljive frakcije nadzemnog dela *G. pyrenaicum* činili su heksadekanska kiselina (15,4%), germakren D (15,4%), (*E*)-kariofilen (10,6%), fitol (10,4%) i kariofilen-oksidi (10,2%). Sličan sastav ulja nadzemnog dela *G. pyrenaicum* dobijenog destilacijom vodenom parom saopštili su Renda i sar. (2016). Heksadekanska kiselina (15,1%), germakren D (11,8%), (*E*)-kariofilen (10,7%) i kariofilen-oksidi (3,8%) su jedinjenja koja čine najveći deo ulja, slično kao i u ispitivanom uzorku, dok prisustvo fitola nije utvrđeno.

Fitol (13,2%), (*E*)-kariofilen (9,5%), pentadekanal (7,6%) i germakren D (7,2%) bili su dominantni sastojci isparljive frakcije nadzemnog dela *G. lucidum*. U prethodnom ispitivanju *G. lucidum* poreklom sa Suve planine, sastav isparljive frakcije dobijene destilacijom cele biljke bio je drugačiji (Radulović i sar., 2011). Najzastupljenije jedinjenje bila je heksadekanska kiselina (32,3%), koja je u velikom udelu zastupljena i u uzorku *G. lucidum* ispitivanom u ovom radu, ali u isparljivoj frakciji podzemnog dela (64,0%). Uočene razlike u sastavu mogu se objasniti različitim geografskim poreklom biljaka, ali i razlikama u delovima biljaka iz kojih su dobijene isparljive frakcije.

Najzastupljeniju grupu jedinjenja u isparljivim frakcijama nadzemnih delova *G. phaeum* i *G. columbinum* činili su diterpeni sa fitolom kao dominantnim sastojkom (41,5% i 29,5%, redom). Pored fitola, u oba uzorka, u značajnom procentu bili su zastupljeni heksahidrofarnezilacetone (15,7% i 4,1%, redom) i heksadekanska kiselina (7,3% i 14,5%, redom). U isparljivoj frakciji *G. phaeum* u većoj količini bio je prisutan je *n*-trikozan (9,7%), dok su pentadekanal (12,5%) i neofitadien (10,5%) zastupljeni u većem procentu u nadzemnom delu *G. columbinum*.

U literaturi postoje podaci o hemijskom sastavu etarskih ulja *G. phaeum* različitog porekla (Radulović i sar., 2013; Chalchat i sar., 2002). U etarskim uljima nadzemnih delova sa Suve Planine sakupljenih tokom dve uzastopne godine uočena je razlika u sadržaju fitola. U jednom fitol je bio dominantan (25,9%), slično kao u uzorku ispitivanom u ovom radu, dok u drugom nije ni detektovan. Dalje, Chalchat i sar. (2002) kao dominantni sastojak ulja nadzemnog dela *G. phaeum* sa planine Strešer navode piperiton, jedinjenje iz grupe monoterpena koje u ispitivanom uzorku nije bilo prisutno.

Poređenjem sa sastavom etarskog ulja nadzemnog dela *G. columbinum* sa Suve Planine (Radulović i sar., 2011), uočavaju se izvesne sličnosti, ali i razlike. Glavna jedinjenja u prethodno ispitanom etarskom ulju bila su heksadekanska kiselina (17,6%) i heksahidrofarnezilacetone (11,6%), koja su prisutna i u frakciji ispitanoj u ovom radu (14,5% i 4,1%, redom). Sa druge strane, fitol je u uzorku sa Suve Planine bio prisutan samo u tragovima, dok je u ispitivanoj frakciji predstavljao dominantno jedinjenje (29,5%).

Što se tiče isparljivih jedinjenja u podzemnim organima ispitivanih vrsta, masne kiseline i njihovi derivati činili su najveći deo isparljivih frakcija podzemnih delova svih ispitivanih biljaka (70,3-95,7%) osim *G. macrorrhizum*. Heksadekanska kiselina bila je najzastupljenije jedinjenje u ovim frakcijama (35,1-79,2%) što je u skladu sa prethodnim zapažanjima. Literaturni podaci ukazuju na visok procenat ove kiseline u etarskim uljima korena *G. columbinum* (60,8%) (Radulović i sar., 2011), *G. phaeum* (55,2%) (Radulović i sar., 2013) i *G. robertianum* (45,3%) (Radulović i sar., 2012). Takođe, visok procenat ove kiseline utvrđen je i u etarskim uljima izolovanim iz celih biljaka *G. lucidum* (32,3%) (Radulović i sar., 2011) i *G. sanguineum* (9,6%) (Radulović i sar., 2012). U literaturi ne postoje podaci o isparljivim frakcijama podzemnih organa *G. lucidum*, *G. sanguineum*, *G. pyrenaicum* i *G. palustre*.

Tabela 15. Hemijski sastav isparljivih frakcija ispitivanih vrsta roda *Geranium* (%)

RI _{eks} ^a	RI _{lit} ^b	Jedinjenje	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. columbinum</i>		<i>G. lucidum</i>	
			n ^c	p ^d	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
850	846	2 <i>E</i> -heksenal	tr	-	0,5 ^e	-	tr	tr	tr	-	tr	-	0,5	-	tr	-	tr	-
902	901	heptanal	tr	tr	tr	-	tr	0,7	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,6	-	tr	-
953	947	2 <i>E</i> -heptenal	tr	-	0,4	-	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
961	952	benzaldehyd	tr	tr	1,1	1,0	0,4	1,3	tr	tr	tr	tr	tr	0,8	0,6	tr	tr	tr
991	984	2-pentilfuran	tr	tr	0,7	1,3	tr	0,7	tr	tr	tr	0,4	tr	0,3	tr	tr	tr	tr
1002	1001 ^f	2 <i>E</i> -2-pentenilfuran	tr	-	0,5	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
1020	1020 ^f	3-etil-4-metilpentan-1-ol	tr	-	-	-	-	tr	-	-	tr	-	tr	-	0,5	-	-	-
1029	1021	limonen	tr	tr	tr	-	tr	tr	0,6	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	tr
1035	1032	1,8-cineol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-
1044	1036	benzenacetaldehyd	tr	-	0,3	-	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
1045	1044	<i>E</i> -β-ocimen	0,5	-	tr	-	-	-	tr	-	-	-	tr	-	-	-	tr	-
1059	1054	γ-terpinen	0,4	tr	-	-	-	-	1,0	tr	tr	-	tr	-	-	-	tr	-
1090	1086	terpinolen	0,5	-	tr	-	-	-	tr	-	tr	-	tr	-	-	-	tr	-
1101	1095	linalol	0,4	tr	2,4	-	tr	tr	5,0	-	0,5	-	3,1	-	tr	-	1,6	2,4
1105	1100	<i>n</i> -nonanal	tr	tr	0,9	tr	tr	0,5	0,8	tr	0,3	tr	tr	tr	0,5	-	0,7	tr
1154	1150	2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> -nonadienal	-	-	0,7	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
1160	1157	2 <i>E</i> -nonenal	tr	-	0,5	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	-
1166	1165	borneol	-	-	-	-	-	-	tr	-	0,7	-	tr	-	-	-	-	-
1178	1176	<i>izo</i> -verbanol	-	0,1	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1193	1186	α-terpineol	0,5	tr	0,6	-	-	tr	0,7	1,9	-	1,8	0,6	0,7	-	-	tr	5,4
1198	1194	mirtenol	tr	0,1	-	-	-	-	tr	-	tr	tr	-	-	tr	-	tr	-
1206	1201	<i>n</i> -dekanal	tr	tr	tr	-	tr	tr	0,6	tr	tr	0,2	tr	-	tr	-	tr	-
1229	1223	citronelol	0,2	-	tr	-	-	-	-	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
1230	1235	izobornilformat	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1255	1249	geraniol	tr	-	tr	-	-	tr	0,7	-	tr	-	0,5	-	tr	-	tr	-

RI _{eks} ^a	RI _{lit} ^b	Jedinjenje	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. columbinum</i>		<i>G. lucidum</i>	
			n ^c	p ^d	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
1262	1267	nonanska kiselina	-	-	-	tr	-	-	-	tr	-	-	-	0,6	-	-	-	-
1295	1292	2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> -dekadienal	-	tr	tr	tr	-	0,7	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-
1308	1305	undekanal	tr	tr	tr	-	tr	0,7	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	-
1317	1315	2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dekadienal	tr	tr	tr	tr	tr	1,2	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	-
1346	1345	silfinen	-	-	-	-	-	-	tr	-	tr	-	0,5	-	tr	-	-	-
1364	1357	2 <i>E</i> -undecenal	-	-	tr	-	tr	-	0,6	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
1369	1369	ciklosativen	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1371	1368 ^f	dekanska kiselina	-	-	-	2,0	-	-	-	tr	-	tr	-	tr	-	-	-	-
1373	1373	α -ilangen	-	0,4	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	tr	tr
1378	1374	α -kopaen	tr	tr	tr	-	tr	tr	-	-	tr	-	1,9	-	tr	-	tr	tr
1383	1382	2-modhefen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
1386	1387	β -burbonen	tr	-	0,6	-	tr	tr	tr	-	0,9	-	tr	-	tr	-	0,8	-
1391	1387	β -kubenen	-	tr	-	-	-	-	-	-	0,5	-	tr	-	tr	-	tr	-
1393	1389	β -elemen	0,4	tr	0,7	-	-	-	1,2	-	tr	-	0,6	-	tr	-	tr	-
1423	1417	<i>E</i> -kariofilen	tr	0,4	3,9	-	tr	tr	8,0	-	10,6	tr	15,7	-	1,3	-	9,5	-
1435	1437	γ -elemen	0,6	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
1445	1440	α -gvajen	-	10,7	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1457	1454	α -humulen	tr	0,4	1,2	-	tr	tr	2,7	-	2,7	-	0,8	-	tr	-	0,4	-
1457	1456	<i>E</i> , <i>E</i> - β -farnezen	tr	-	-	-	tr	tr	0,3	-	tr	-	tr	-	tr	-	3,5	-
1462	1464	2 <i>E</i> -dodecenal	tr	-	0,7	-	tr	-	0,6	-	tr	-	0,6	-	0,6	-	0,5	-
1462	1464	9- <i>epi-E</i> -kariofilen	tr	-	0,3	-	tr	tr	-	-	tr	-	tr	-	-	-	tr	-
1480	1478	γ -murolen	-	0,7	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
1483	1481	γ -kurkumen	1,4	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1485	1484	germakren D	0,4	-	5,2	-	0,4	tr	3,7	-	15,4	-	9,7	-	2,2	-	7,2	-
1488	1487	<i>E</i> - β -jonon	-	-	1,6	-	1,3	tr	1,8	-	tr	-	-	-	2,0	-	1,0	-
1494	1489	β -selinen	tr	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	18,6	-	-	-	-	-

RI _{eks} ^a	RI _{lit} ^b	Jedinjenje	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. columbinum</i>		<i>G. lucidum</i>	
			n ^c	p ^d	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
1497	1493	α -zingiberen	-	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-
1499	1498	α -selinen	tr	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	-	-	-	-	-
1500	1500	biciklogermakren	-	-	tr	-	-	-	-	-	0,9	-	tr	-	0,2	-	tr	-
1508	1508	izodaucen	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	-	-
1508	1508	germakren A	tr	-	tr	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1509	1505	<i>E,E</i> - α -farnezen	0,7	-	-	-	-	tr	-	-	0,8	-	-	-	-	-	1,6	-
1511	1505	β -bisabolen	-	-	5,2	-	tr	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-
1515	1514	β -kurkumen	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-
1519	1514	<i>Z</i> - γ -bisabolen	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-
1525	1510	α -bulnezen (δ -gvajen)	tr	76,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1527	1522	δ -kadinen	tr	0,5	1,0	tr	tr	tr	tr	-	0,8	-	0,3	-	tr	-	1,4	tr
1535	1529	<i>E</i> - γ -bisabolen	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-
1545	1540 ^s	<i>Z</i> - α -bisabolen	-	-	tr	-	-	-	tr	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-
1548	1544	α -kalakoren	-	0,2	tr	-	-	tr	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	tr
1562	1559	germakren B	8,5	tr	tr	-	-	-	0,7	-	0,4	-	tr	-	-	-	tr	-
1565	1561	<i>E</i> -nerolidol	-	-	0,5	-	-	-	tr	-	-	-	tr	-	tr	-	tr	-
1568	1564	β -kalakoren	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1568	1568	dodekanska kiselina	-	-	tr	2,1	-	2,0	tr	3,1	-	0,8	tr	0,6	-	-	tr	-
1580	1575	germakren D-4-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-
1582	1577	spatulenol	-	-	-	-	0,4	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-
1587	1583	kariofilen-oksidi	tr	tr	2,0	-	1,2	0,7	7,4	-	10,2	0,5	1,3	-	tr	-	tr	-
1608	1601	<i>trans</i> - β -elemenon	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1612	1608	humulen-epoksid II	-	0,1	0,3	-	tr	-	2,5	-	1,7	-	tr	-	-	-	-	-
1612	1611	tetradekanal	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	tr	-	-	1,1	-	0,8	-
1617	1624 ^h	selin-6-en-4 α -ol	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1630	1630	γ -eudezmol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-

RI _{eks} ^a	RI _{lit} ^b	Jedinjenje	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. columbinum</i>		<i>G. lucidum</i>		
			n ^c	p ^d	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	
1630	1627	1- <i>epi</i> -kubenol	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	0,9	-
1644	1644	<i>epi</i> - α -murolol	-	0,2	tr	-	tr	tr	tr	-	0,5	-	tr	-	tr	-	tr	-	
1652	1649	β -eudezmol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	
1654	1652	α -eudezmol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	
1657	1654	α -kadinol	-	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	0,8	-	tr	-	tr	-	tr	-	
1656	1658	selin-11-en-4 α -ol	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1668	1674	Z- α -santalol	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1668	-	derivat geraniola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3	
1674	1668	14-hidroksi-9- <i>epi</i> -kariofilen	-	tr	tr	-	-	-	tr	-	0,3	-	tr	-	-	-	tr	-	
1676	1675	kadalen	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	0,5	tr	
1677	1671	tetradekanol	-	-	tr	-	tr	2,4	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	-	-	
1699	1694	germakron	73,3	0,8	tr	-	-	-	tr	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	
1714	1715	pentadekanal	-	0,4	2,3	tr	0,8	1,7	4,4	-	0,8	tr	0,5	tr	12,5	-	7,6	-	
1744	1746	selina-1,3,7(11)-trien-8-on epoksid	3,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1767	1769	tetradekanska kiselina	-	-	0,5	4,5	-	4,1	2,2	5,9	0,3	3,6	tr	1,7	0,7	-	3,0	-	
1776	1773	α -kostol	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1779	1773	pentadekanol	tr	tr	tr	-	tr	1,3	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-	
1808	1793	izovalencenol	0,3	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1808	1789	oktadecen	0,1	-	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	
1839	1840 ⁱ	neofitadien	tr	-	tr	-	1,0	-	tr	-	2,4	-	8,9	-	10,5	-	-	-	
1846	1846 ^j	heksahidrofarnezil-aceton	0,1	tr	4,8	2,1	15,7	0,8	4,5	2,4	2,2	2,3	3,2	0,5	4,1	20,7	2,7	-	
1857	-	14-pentadecenska kiselina	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	
1865	1865 ^k	pentadekanska kiselina	tr	tr	tr	-	-	1,6	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	-	-	tr	

RI _{eks} ^a	RI _{lit} ^b	Jedinjenje	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. columbinum</i>		<i>G. lucidum</i>	
			n ^c	p ^d	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
1880	1874	heksadekanol	tr	tr	tr	-	tr	1,3	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
1894	-	heptadekatrienal	0,4	tr	-	-	-	-	1,5	-	-	-	tr	-	0,6	-	3,2	-
1899	1900	<i>n</i> -nonadekan	tr	tr	tr	-	tr	tr	0,8	-	tr	-	tr	-	0,6	-	tr	-
1921	1913	<i>5E,9E</i> -farnezilaceton	tr	-	1,4	-	0,6	tr	1,5	-	tr	1,3	1,0	-	1,1	-	1,7	-
1948	1945	izofitol	tr	-	1,6	-	0,5	-	tr	-	tr	-	0,5	-	1,1	-	0,6	-
1949	1948 ^l	9-heksadecenska kiselina	-	-	-	-	-	6,9	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
1977	1959	heksadekanska kiselina	0,7	0,6	21,1	71,6	7,3	35,1	12,5	68,8	15,4	71,8	6,6	67,9	14,5	79,2	6,9	64,0
1995	1992	etilheksadekanoat	-	-	-	-	0,6	4,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2030	2026	<i>E,E</i> -geranil-linalol	tr	tr	0,8	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	tr
2059	2060 ^m	<i>9Z</i> -oktadecen-1-ol	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2082	2077	oktadekanol	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	2,0	-
2099	2100	<i>n</i> -heneikozan	tr	0,3	2,8	-	2,9	tr	4,9	-	0,9	0,6	tr	-	0,8	-	1,1	-
2118	2118	fitol	0,9	-	17,8	-	41,5	tr	19,3	-	10,4	-	9,9	-	29,5	-	13,2	-
2140	2132	linolna kiselina	tr	tr	tr	10,8	tr	9,7	0,9	17,9	3,1	12,8	tr	16,4	1,3	tr	tr	6,3
2163	2163 ⁿ	etillinoleat	-	-	-	-	tr	7,0	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-
2170	2173 ^o	etillinolenat	-	-	-	-	1,0	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2198	2200	<i>n</i> -dokozaan	tr	0,2	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-
2254	2269	sandarakopimarinol	tr	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2263	2265 ^p	2-metildokozaan	-	-	1,5	-	0,9	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-
2273	2271 ^q	9-trikozen	-	tr	-	-	0,6	-	tr	-	tr	-	-	-	-	-	tr	-
2301	2300	<i>n</i> -trikozaan	tr	0,2	3,4	-	9,7	0,7	4,7	-	7,2	-	1,7	-	1,9	-	1,2	-
2373	-	C ₂₄ H ₅₀	tr	-	tr	-	2,7	-	-	-	1,2	-	0,3	-	-	-	-	-
-	-	nije identifikovano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,5	-
2474	2473 ^q	9-pentakozan	tr	-	-	-	1,6	-	tr	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
2492	2492 ^r	1-pentakozan	tr	-	-	-	1,4	-	-	-	1,1	-	tr	-	-	-	-	-

RI _{eks} ^a	RI _{lit} ^b	Jedinjenje	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. columbinum</i>		<i>G. lucidum</i>	
			n ^c	p ^d	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
2499	2500	<i>n</i> -pentakozan	tr	-	0,8	-	1,6	2,4	1,0	tr	0,9	-	0,4	-	0,5	tr	0,7	tr
2699	2700	<i>n</i> -heptakozan	tr	tr	1,9	tr	1,7	1,2	0,9	tr	1,4	tr	1,0	-	0,8	tr	1,0	tr
2830	2833 ^s	skvalen	-	tr	tr	-	tr	1,3	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-
2900	2900	<i>n</i> -nonakozan	0,3	tr	2,0	tr	1,4	tr	tr	-	2,6	1,3	0,4	-	2,2	tr	1,6	4,6
3100	3100	untriakontan	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,7	tr	0,4	tr	tr	-	2,8	tr	2,9	16,9
monoterpeni			2,5	0,2	2,9	-	tr	tr	8,0	1,9	0,5	2,5	4,2	1,0	tr	-	5,9	7,8
monoterpenski ugljovodonici			1,4	tr	tr	-	tr	tr	1,6	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	tr
oksidovani monoterpeni			1,1	0,2	2,9	-	tr	tr	6,4	1,9	0,5	2,5	4,2	1,0	tr	-	5,9	7,8
seskviterpeni			92,3	94,6	29,0	2,1	18,4	1,5	33,6	2,4	50,1	4,1	61,8	2,5	10,8	20,7	30,3	tr
seskviterpenski ugljovodonici			11,9	92,2	20,0	tr	0,4	tr	17,7	-	32,9	tr	56,4	-	5,7	-	24,9	tr
oksidovani seskviterpeni			80,4	2,4	9,0	2,1	18,0	1,5	15,8	2,4	17,2	4,1	5,4	2,5	5,1	20,7	5,3	-
diterpeni			0,9	0,1	20,2	-	43,0	tr	19,3	-	12,9	-	19,3	-	41,1	-	14,8	tr
diterpenski ugljovodonici			tr	-	tr	-	1,0	-	tr	-	2,4	-	8,9	-	10,5	-	-	-
oksidovani diterpeni			0,9	0,1	20,2	-	42,0	tr	19,3	-	10,4	-	10,4	-	30,6	-	14,8	tr
masne kiseline i njihovi derivati			0,7	0,6	21,6	92,4	8,9	76,6	15,6	95,7	18,8	91,0	6,6	87,5	16,4	79,2	9,9	70,3
drugo			0,8	1,1	22,6	2,3	27,0	17,7	23,2	tr	16,7	2,4	6,0	1,0	28,7	tr	24,1	21,5
ukupno			97,3	96,5	96,4	96,7	97,3	95,8	99,6	98,1	98,9	100	97,8	92,0	97,0	99,9	84,9	99,6

^a Retencioni indeksi na HP-5MS koloni računati u odnosu na homologi niz *n*-alkana (C₉-C₄₀). ^b Retencioni indeksi iz literature (Adams, 2007). ^c Nadzemni delovi. ^d Podzemni delovi. ^e Relativni udeo jedinjenja u isparljivoj frakciji. ^f Zhao Zeng i sar. (2007). ^g Custers (2009). ^h Cardeal i sar. (2006). ⁱ Kukić i sar. (2006). ^j Stojanović i sar. (2000). ^k Lazari i sar. (2000). ^l Leffingwell i Alford (2005). ^m Jerković i sar. (2010). ⁿ Andriamaharavo (2014). ^o Zhao i sar. (2006). ^p Zaikin i Borisov (2002). ^q Ruther i sar. (1998). ^r Flamini i sar. (2006). ^s Radulović i sar. (2010).

Statistička klaster analiza

Rezultati analize sastava isparljivih frakcija ispitivanih biljaka statistički su obrađeni primenom UPGMA (*Unweighted Pair-Group Arithmetic Averages clustering*) metode, pri čemu je analiza uključivala relativne procenete svih komponentata prisutnih u isparljivim frakcijama.

Na dobijenom dendrogramu (Slika 23) uočena je podela ispitivanih frakcija u dve grupe.

Prvu grupu činile su frakcije *G. macrorrhizum* koje su se izdvojile zbog visokog sadržaja germakrona (73,3%) u isparljivoj frakciji nadzemnog, odnosno δ -gvajena (76,8%) u isparljivoj frakciji podzemnog dela.

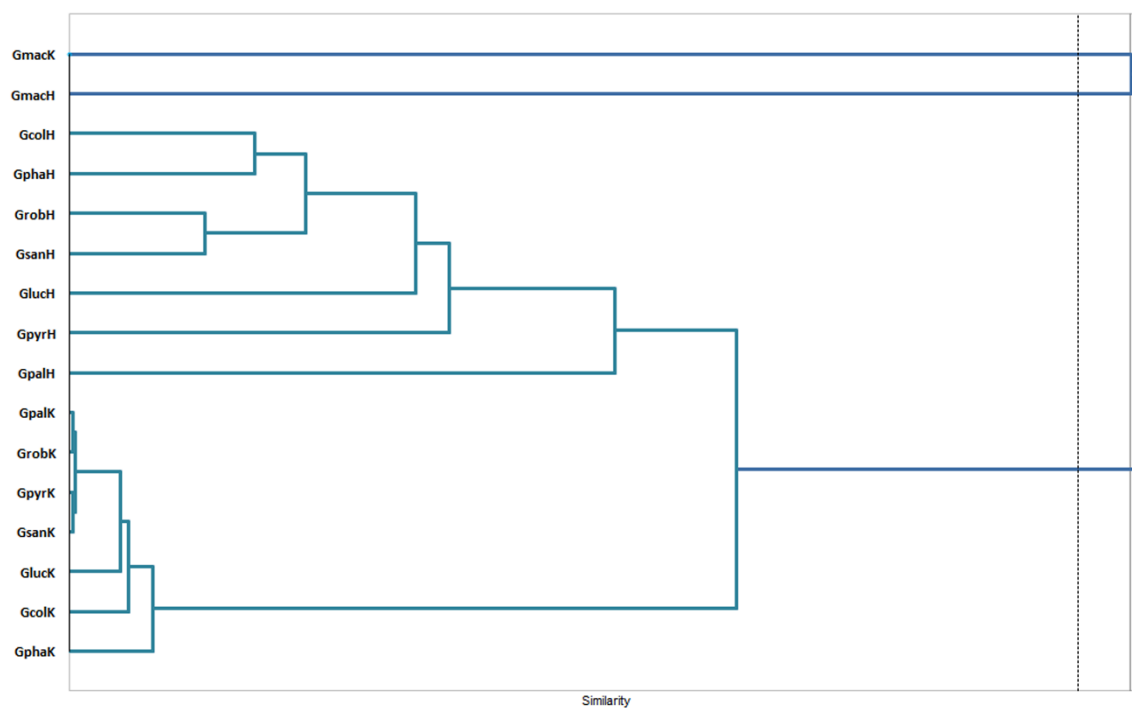
U okviru druge grupe izdvojile su se dve glavne podgrupe u okviru kojih su se frakcije dalje grupisale.

Prva podgrupa je zbog visokog sadržaja heksadekanske kiseline obuhvatila isparljive frakcije podzemnih, a druga podgrupa isparljive frakcije nadzemnih organa svih ostalih vrsta usled značajne količine terpenkih jedinjenja (seksviterpena i diterpena). U okviru prve podgrupe izdvojila se frakcija *G. phaeum* zbog nešto nižeg sadržaja heksadekanske kiseline, a zbog visokog sadržaja heksahidrofarnesilacetona iz preostalih frakcija izdvojila se ona dobijena iz *G. columbinum*. Dalje, iz ostatka izdvojila se frakcija *G. lucidum* koja se karakteriše visokim sadržajem untriakontana. Na kraju, grupisale su se frakcije *G. palustre* i *G. robertianum* sa jedne i *G. pyrenaicum* i *G. sanguineum* sa druge strane, a kao posledica različitog sadržaja linolne kiseline. Izomeri eudezmola prisutni u frakciji *G. palustre* odvajaju je od frakcije *G. robertianum*. Razlika između frakcija *G. pyrenaicum* i *G. sanguineum* ogleda se u prisustvu monoterpenkih jedinjenja.

Iz druge podgrupe, koja je obuhvatala frakcije nadzemnih organa svih ispitivanih vrsta, sukcesivno su se izdvojile frakcije nadzemnih delova *G. palustre* (zbog visokog sadržaja β -selinena), *G. pyrenaicum* (zbog visokog sadržaja germakrona D) i *G. lucidum* (zbog prisustva jedinjenja koje nije identifikovano). U okviru ostalih frakcija izvršeno je grupisanje *G. columbinum* i *G. phaeum* i *G. robertianum* i *G. sanguineum*, a na osnovu većeg sadržaja fitola u prve dve frakcije. Razlika između *G. columbinum* i *G. phaeum* ogleda se u značajno većem sadržaju pentadekanala i neofitadiena u frakciji *G. columbinum*. Prisustvo β -bisabolena razlikuje frakciju *G. sanguineum* od frakcije *G. robertianum*.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da se *G. macrorrhizum* kao jedini predstavnik sekcije *Unguiculata* izdvaja od svih ostalih ispitivanih vrsta u pogledu hemijskog sastava isparljivih frakcija.

Isparljive frakcije podzemnih organa ostalih ispitivanih *Geranium* vrsta donekle su slične jer kao dominantno jedinjenje sadrže heksadekansku kiselinu, a razlike između vrsta potiču pre svega od razlika u sastavu isparljivih frakcija nadzemnih delova. Grupisanje ostalih vrsta na osnovu sastava isparljivih frakcija nije u skladu sa njihovom taksonomskom klasifikacijom.



Slika 23. Klaster analiza sastojaka isparljivih frakcija *Geranium* vrsta na osnovu *Pearson*-ovih distanci u UPGMA metodi spajanja

2. Hemijska analiza metanolnih ekstrakata

2.1. Sadržaj ukupnih polifenola i tanina

Sadržaj ukupnih polifenola i tanina u suvim metanolnim ekstraktima podzemnih i nadzemnih delova ispitivanih *Geranium* vrsta određen je spektrofotometrijski na osnovu bojene reakcije sa fosfomolibdovolframovom kiselinom (Folin-Ciocalteu reagens, FC). Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg GAE/g) (Tabela 16).

Utvrđeno je da su ekstrakti i nadzemnih i podzemnih organa veoma bogati polifenolnim jedinjenjima, sa sadržajem ukupnih polifenola u opsegu od 170,64 do 636,321 mg GAE/g suvog ekstrakta.

Sadržaj ukupnih polifenola bio je viši u ekstraktima podzemnih organa u odnosu na ekstrakte nadzemnih delova, sa izuzetkom *G. robertianum*, *G. sanguineum* i *G. lucidum*.

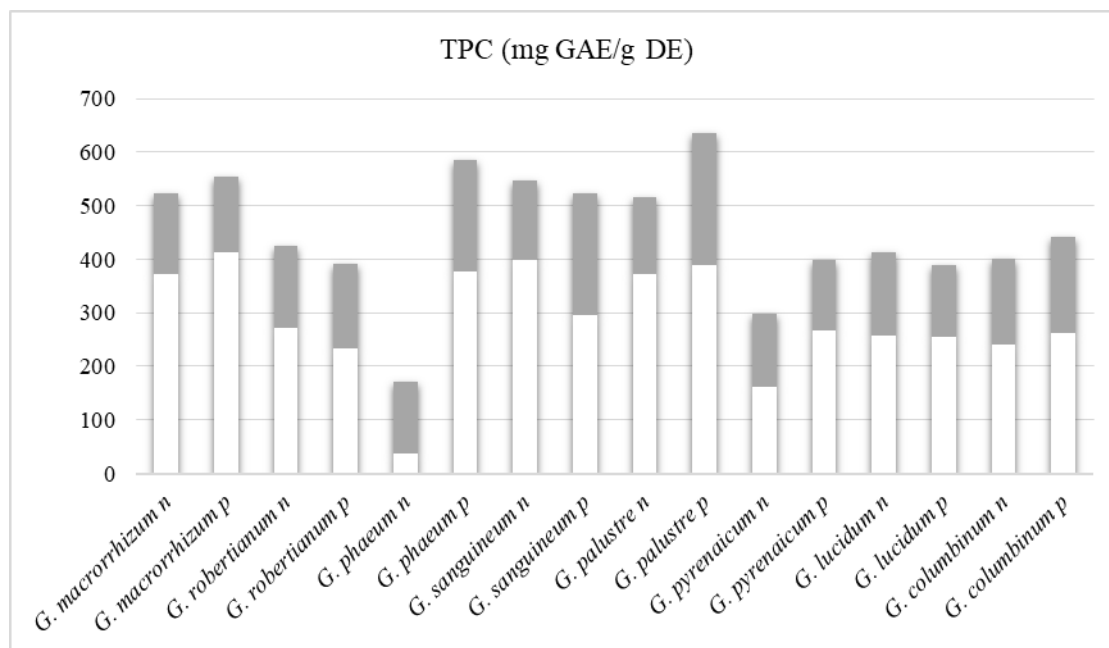
Tabela 16. Sadržaj ukupnih polifenola i tanina u ispitivanim uzorcima

		Ukupni polifenoli (mg GAE/g)	Ukupni tanini (mg GAE/g)
<i>G. macrorrhizum</i>	n ^a	523,96±2,28 ^c	372,66±6,92
	p ^b	553,40±8,72	414,02±9,46
<i>G. robertianum</i>	n	425,31±3,37	270,72±3,67
	p	390,29±6,10	233,00±3,12
<i>G. phaeum</i>	n	170,64±1,08	37,80±1,33
	p	586,34±6,14	376,32±5,33
<i>G. sanguineum</i>	n	547,38±5,83	398,36±5,47
	p	523,52±5,60	295,87±2,71
<i>G. palustre</i>	n	515,24±1,15	371,73±1,35
	p	636,32±7,51	389,77±8,87
<i>G. pyrenaicum</i>	n	298,73±6,47	161,14±6,34
	p	397,69±4,00	266,33±0,72
<i>G. lucidum</i>	n	413,45±5,85	257,53±7,08
	p	388,19±5,24	253,74±4,52
<i>G. columbinum</i>	n	400,57±4,99	239,88±4,82
	p	441,93±3,87	261,19±2,80

^a Ekstrakt nadzemnog dela; ^b Ekstrakt podzemnog dela; ^c Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti tri određivanja ± standardna devijacija (SD).

Najveći sadržaj polifenola utvrđen je u ekstraktima podzemnih organa *G. palustre* (636,32 mg GAE/g), *G. phaeum* (586,34 mg GAE/g), *G. macrorrhizum* (553,40 mg GAE/g), kao i u ekstraktu nadzemnog dela *G. sanguineum* (547,38 mg GAE/g), dok je sadržaj polifenolnih jedinjenja bio najniži u ekstraktima nadzemnih delova *G. pyrenaicum* (298,73 mg GAE/g) i *G. phaeum* (170,64 mg GAE/g)

Udeo tanina u ukupnim polifenolima prikazan je na Slici 24. Tanini su činili dominantu grupu polifenolnih jedinjenja u svim uzorcima (161,14-414,02 mg GAE/g), osim u ekstraktu nadzemnog dela *G. phaeum* (37,80 mg GAE/g).



Slika 24. Sadržaj ukupnih polifenola i tanina (beli deo kolone predstavlja sadržaj tanina u okviru fenolnih jedinjenja; n - ekstrakt nadzemnog dela; p - ekstrakt podzemnog dela; TPC – sadržaj ukupnih polifenola; DE – suvi ekstrakt.

Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja pokazuju da su vrste roda *Geranium* bogate fenolnim sastojcima među kojima su dominantna jedinjenja taninske prirode (Bate-Smith, 1973; Grača i sar., 2016a).

U poređenju sa dobijenim rezultatima, Radulović i sar. (2012) utvrdili su niži sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima lista i rizoma *G. macrorrhizum* (160,2 i 85,7 mg GAE, redom). Niži sadržaj ukupnih polifenola prethodno je utvrđen i u ekstraktu nadzemnog dela *G. lucidum* (Wafa i sar., 2017).

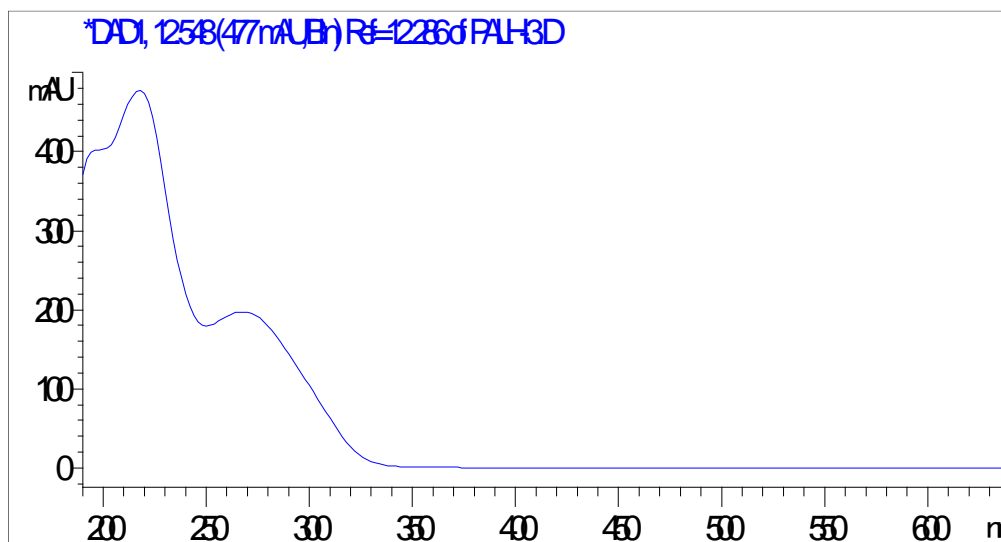
2.2. Rezultati utvrđivanja hemijske strukture sekundarnih metabolita izolovanih iz metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *G. palustre*

Iz metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *G. palustre*, primenom hromatografije u koloni izolovana su dva jedinjenja, i to jedan hidrolizujući tanin (jedinjenje 1) i jedno flavonoidno jedinjenje (jedinjenje 2).

Strukture izolovanih jedinjenja utvrđene su interpretacijom dobijenih UV-Vis, ESI-MS i NMR spektara, kao i njihovim poređenjem sa literaturnim podacima.

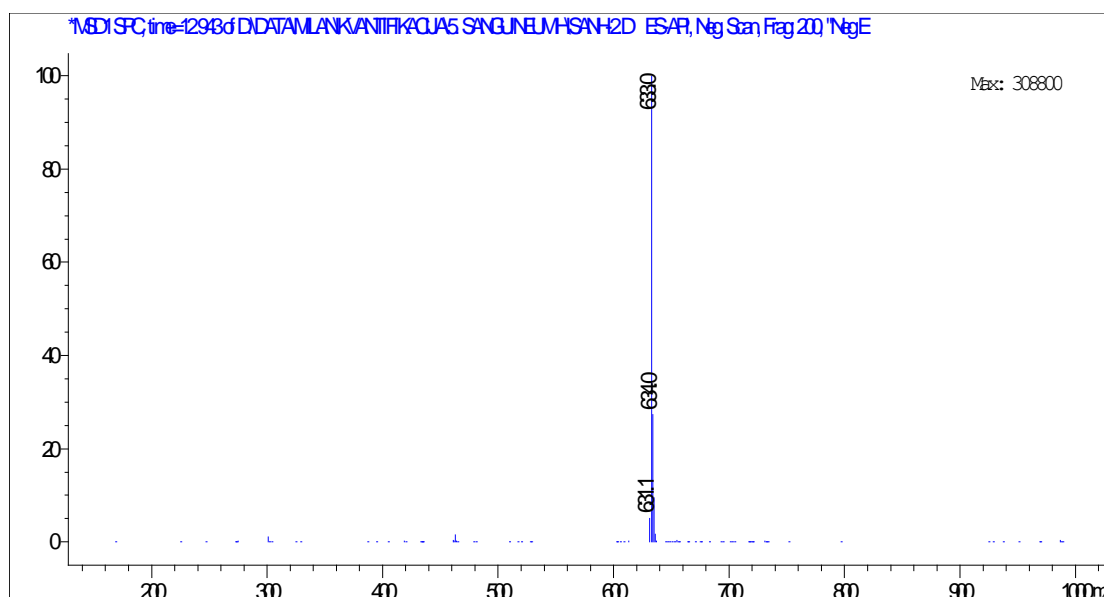
Jedinjenje 1

UV-Vis spektar jedinjenja **1** karakterišu dva maksimuma apsorpcije, na 220 nm i 276 nm (Slika 25) što odgovara spektru elagnih tanina. UV-Vis spektri elagnih tanina koji sadrže galoil grupe slični su odgovarajućim spektrima galoil-glukoza. Obe grupe jedinjenja daju maksimume na gotovo istim talasnim dužinama (oko 218 nm i oko 280 nm), s tim da je u slučaju elagnih tanina kriva između dva maksimuma manje strma (Salminen i sar., 1999; Moilanen i sar., 2013).



Slika 25. UV-Vis spektar jedinjenja **1**

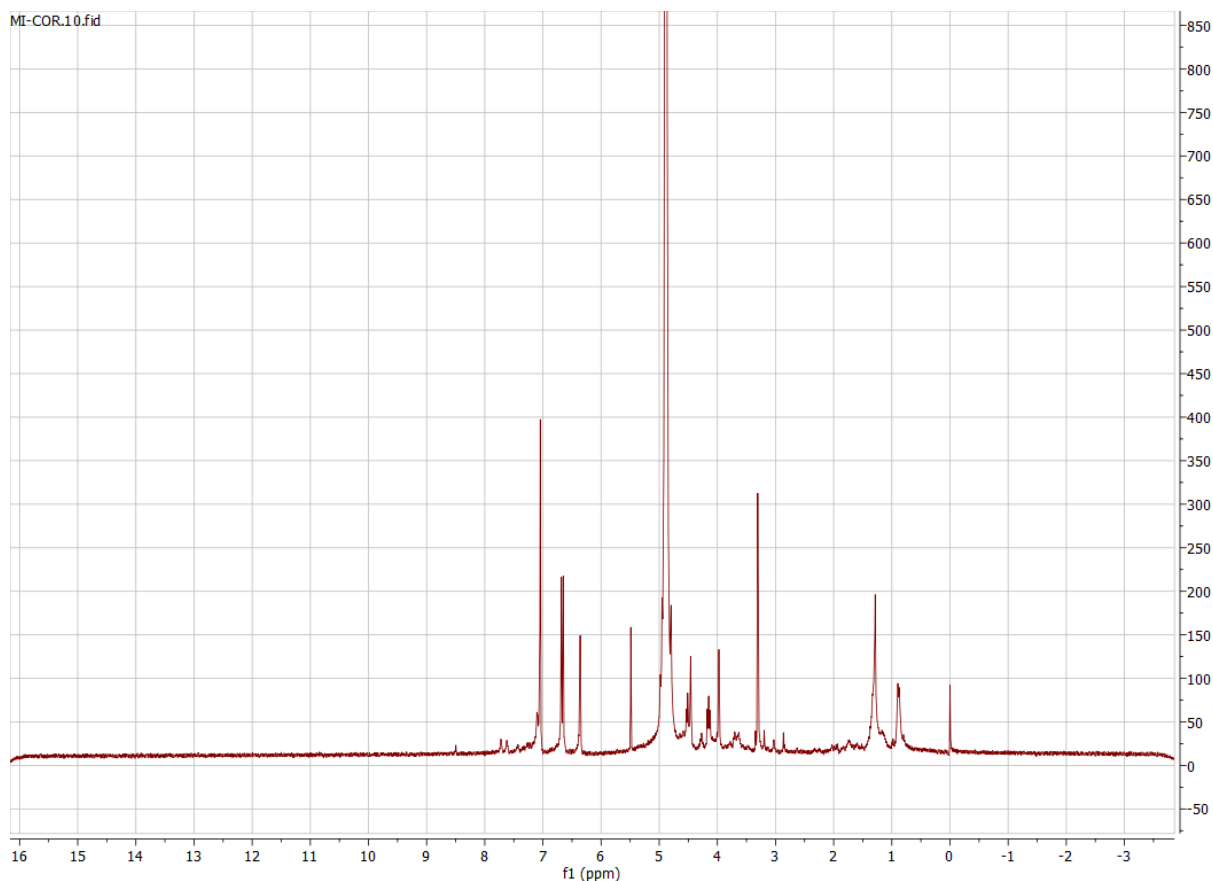
Na osnovu masenog spektra u kome je signal kvazimolekulskog jona $[M-H]^-$, snimljen u negativnom modu pri naponu fragmentora 100 V, bio pozicioniran na vrednosti m/z 633 utvrđeno je da molekulska masa jedinjenja **1** iznosi 634. Povećanjem napona fragmentora na 250 V, uočeni su dodatni signali; signal na m/z 463 koji potiče od ostatka nastalog odvajanjem molekula galne kiseline $[M-170-H]^-$ i signal na m/z 301 koji potiče od fragmenta nastalog cepanjem ostatka galoilglukoze $[M-332-H]^-$ (Slika 26).



Slika 26. Maseni spektar jedinjenja **1**

Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima i podudaraju se sa profilom fragmentacije elagnih tanina (Zhu i sar., 2015).

U ^1H NMR spektru jedinjenja **1** (Slika 27) uočeni su signali u vidu singleta sa pomeranjem od 6,65-7,05 ppm koji potiču od aromatičnih vodonika galoil i heksahidroksidifenoil ostataka. U oblasti 3,97-6,36 ppm nalaze se signali poreklom od protona centralnog molekula glukoze, s tim da signal vode pokriva signale H-3 i H-6a. Tačan položaj signala koji potiču od ovih protona utvrđen je pomoću dvodimenzionalnog HSQC spektra (Slika 29).

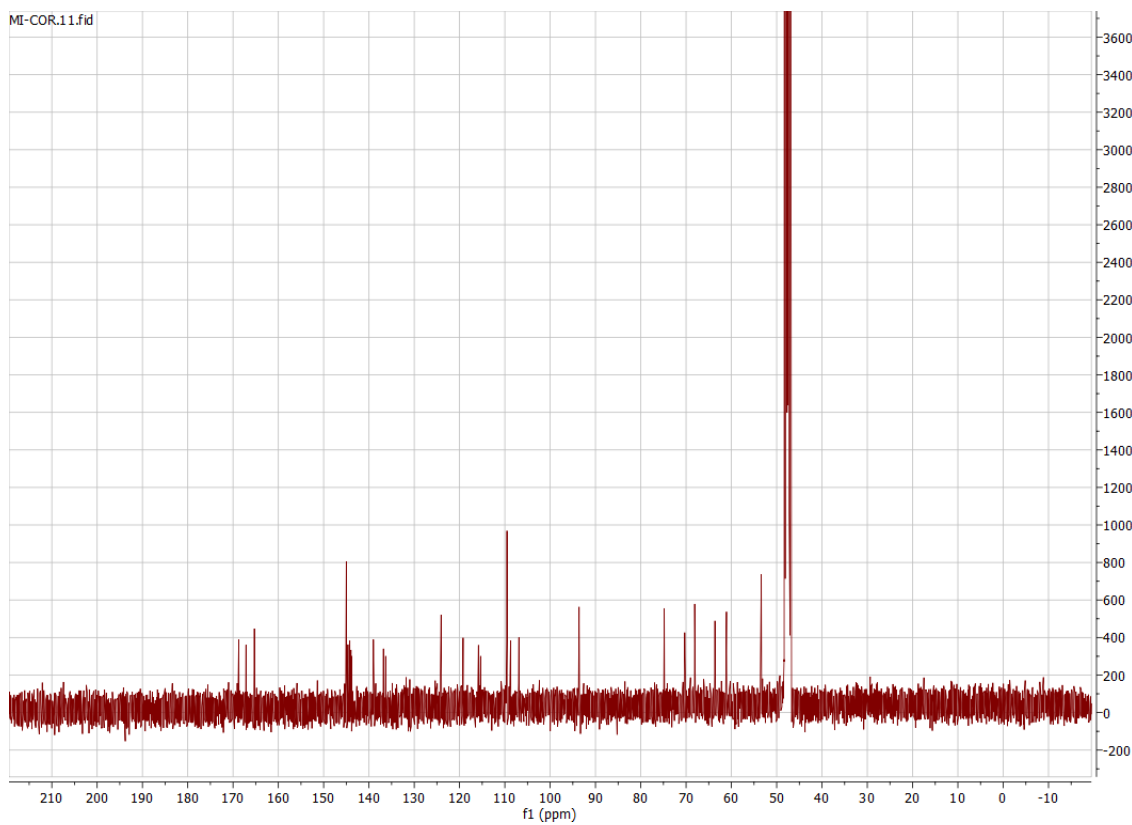


Slika 27. ^1H NMR spektar jedinjenja **1**

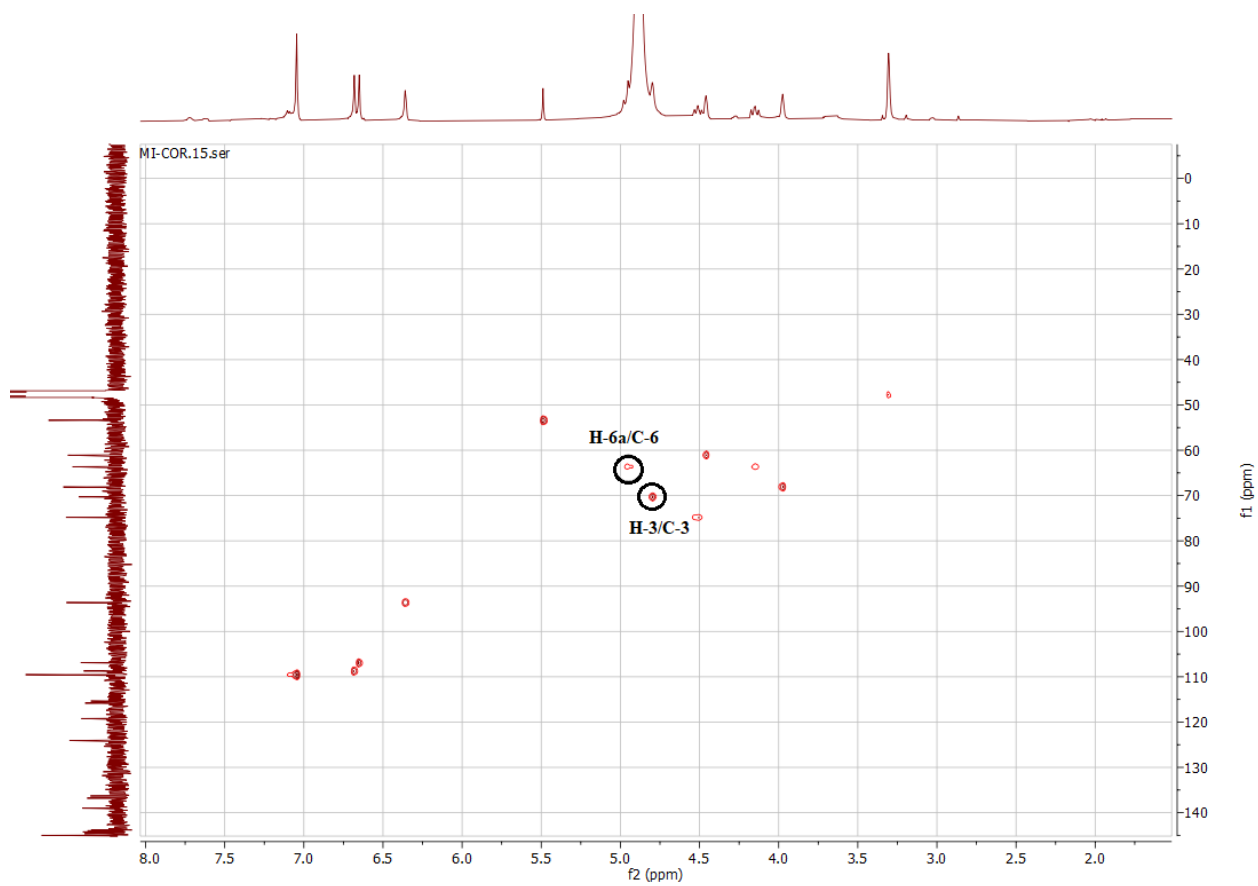
U ^{13}C NMR spektru jedinjenja **1** (Slika 28) signali koji potiču od galoil i heksahidroksidifenoil ostataka detektovani su u opsegu 106,89-169,73 ppm, dok se signali molekula glukoze nalaze u oblasti od 61,08-93,61 ppm.

Eksperimentalne vrednosti pomeranja protona i ugljenikovih atoma dobijene analizom ^1H NMR i ^{13}C NMR jedinjenja **1** u saglasnosti su sa literaturnim podacima za korilagin (Sudjaroen i sar., 2012; Moreira i sar., 2013; Yakubu i sar., 2019).

Na osnovu dvodimenzionalnog NMR HSQC spektra jedinjenja **1** utvrđen je položaj signala koji potiču od protona H-3 i H-6a, a koji su u ^1H NMR spektru bili prekriveni signalom vode. U HSQC spektru uočeno je sprezanje C-6 atoma glukoze na 63,63 ppm sa protonom metilenske grupe, H-6a na 4,95 ppm, odnosno sprezanje C-3 atoma glukoze (70,29 ppm) sa protonom metilenske grupe, H-3 na 4,80 ppm (Slika 29).



Slika 28. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 1



Slika 29. HSQC spektar jedinjenja 1

Spektralni podaci jedinjenja 1 (korilagin; 1-*O*-galoil-3,6-heksahidroksidifenoil-*D*-glukoza):

UV λ_{\max} : 276 nm, 220 nm.

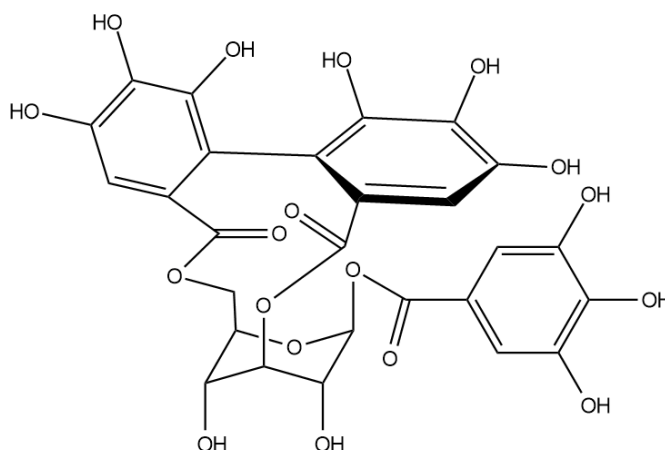
ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentatora 100 V): 633 [M-H]⁻

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentatora 250 V): 633 [M-H]⁻, 463 [M-170-H]⁻, 301 [M-332-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,05 (2H, *s*, galoil-H), 6,68 (1H, *s*, HHDP-H), 6,65 (1H, *s*, HHDP-H), 6,36 (1H, *d*, H-1), 4,51 (1H, *t*, $J=9,6$ Hz, H-5), 4,46 (1H, *dd*, H-4), 4,15 (1H, *dd*, $J=8,2$ Hz, 10,5 Hz, H-6b), 3,97 (1H, *d*, H-2).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 168,73, 167,14, 165,29 (3 x -COO), 145 (C-3, C-5 Gal), 144,63, 144,23, 143,97, 143,87 (C-4, C-4', C-6, C-6' HHDP), 139,01 (C-4 Gal), 136,80, 136,31 (C-5, C-5' HHDP), 124,07, 124,05 (C-2, C-2' HHDP), 119,21 (C-1 Gal), 115,82, 115,35 (C-1, C-1' HHDP), 109,53 (C-2, C-6 Gal), 108,73, 106,89 (C-3, C-3' HHDP), 93,61 (C-1 Glu), 74,82 (C-5 Glu), 70,29 (C-3 Glu), 68,1 (C-2 Glu), 63,63 (C-6 Glu), 61,08 (C-4 Glu).

Na osnovu UV-Vis spektra, masenog spektra, ¹H, ¹³C i HSQC NMR spektara jedinjenje 1 identifikovano je kao elagni tanin **korilagin** (1-*O*-galoil-3,6-heksahidroksidifenoil-*D*-glukoza) (Slika 30) (Sudjaroen i sar., 2012; Moreira i sar., 2013; Zhu i sar., 2015; Yakubu i sar., 2019).

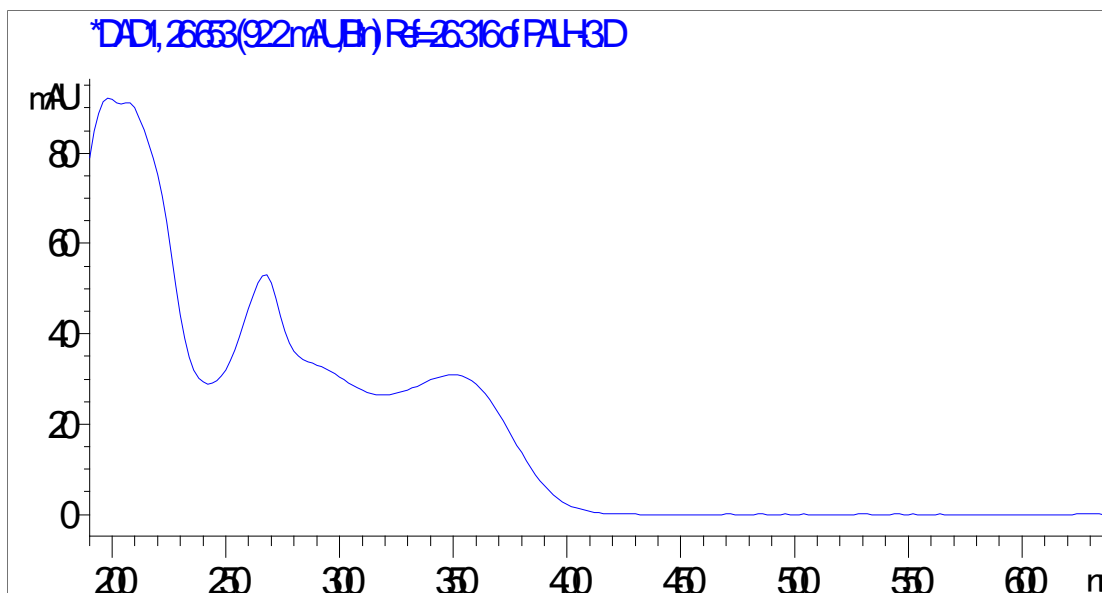


Slika 30. Jedinjenje 1

(korilagin; 1-*O*-galoil-3,6-heksahidroksidifenoil-*D*-glukoza)

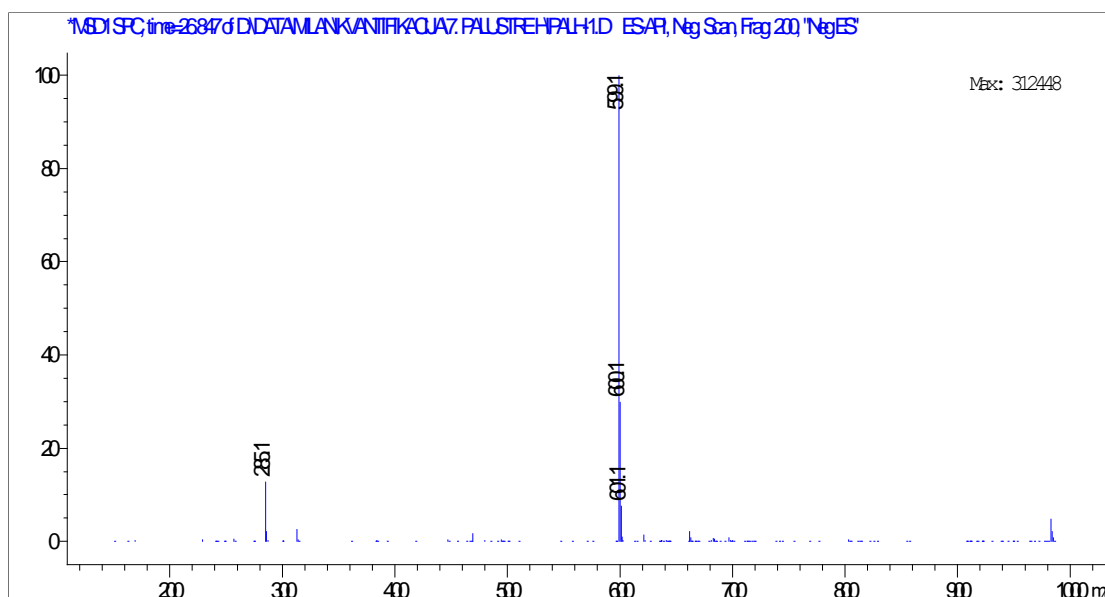
Jedinjenje 2

U UV-Vis spektru jedinjenja 2 (Slika 31) uočavaju se dve apsorpcione trake sa maksimumima karakterističnim za flavonoidna jedinjenja koja daju traku I u opsegu 300-380 nm i traku II u opsegu 240-280 nm (Mabry i sar., 1970). Maksimum trake I jedinjenja 2 nalazio se na 350 nm što odgovara flavonolima sa supstituisanom hidroksilnom grupom u položaju 3 (Santos-Buelga i sar., 2003; Alonso-Salces i sar., 2004). ApSORPCIONI maksimum trake II nalazio se na 268 nm. U UV-Vis spektru jedinjenja 2 uočeno je i „rame“ na 296 nm što ukazuje na postojanje galoil grupe vezane za heterozid, koja daje ovakav izgled UV-Vis spektru (Collins i sar., 1975).



Slika 31. UV-Vis spektar jedinjenja 2

U masenom spektru jedinjenja 2, snimljenom u negativnom modu pri naponu fragmentora od 100 V, kvazimolekularni jon $[M-H]^-$ je dao signal na vrednosti m/z od 599. Dodatni signal na vrednosti m/z od 285 detektovan je nakon povećanja napona fragmentora na 200 V i potiče od flavonolnog aglikona kemferola (Slika 32).



Slika 32. Maseni spektar jedinjenja 2

U ^1H NMR spektru jedinjenja 2 (Slika 33) uočeni su signali koji potiču od aromatičnih protona sa pomeranjem od 6,12-7,95 ppm uključujući i vodonikove atome galne kiseline (δ 7,12 ppm) kojom je esterifikovan molekul šećera. Protoni šećerne komponente dali su signale u opsegu od 3,41-5,75 ppm.

U ^{13}C NMR spektru jedinjenja 2 (Slika 34) signali koji potiču od flavonoidnog dela aglikona dali su pomeranja u opsegu od 93,21-177,77 ppm, a signali galne kiseline i šećernog dela u opsegu od 109,16-166,28 ppm, odnosno 61,15-98,36 ppm.

Spektralni podaci jedinjenja 2 (astragalin-2''-O-galat (kemferol-3-O-(2''-O-galoil-β-D-glukozid)):

UV λ_{\max} : 350 nm, 296sh nm, 268 nm.

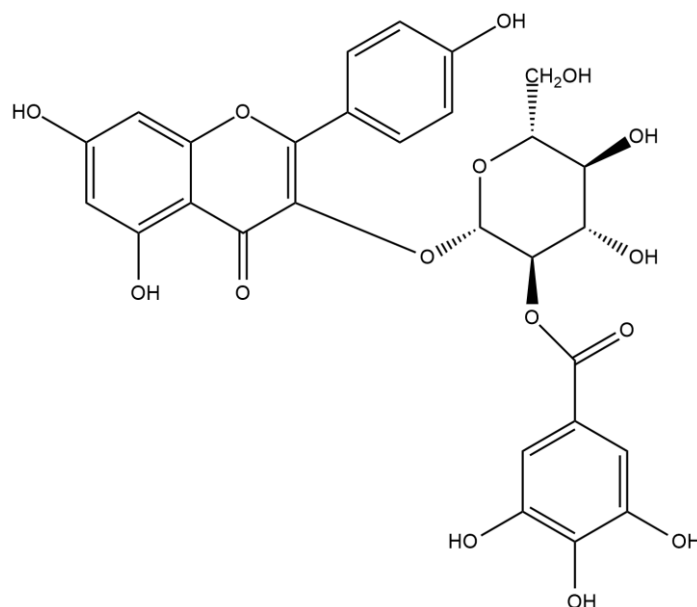
ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentatora 100 V): 599 [M-H]⁻

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentatora 200 V): 599 [M-H]⁻, 285 [M-H-galoilglukoza]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,95 (2H, *d*, *J*=8.3 Hz, H-2' i H-6'), 7,12 (2H, *s*, H-2''' i H-6'''), 6,85 (2H, *d*, *J*=8.5 Hz, H-3' i H-5'), 6,34 (1H, *s*, H-8), 6,16 (1H, *s*, H-6), 5,75 (1H, *d*, *J*=8 Hz, H-1''), 5,10 (1H, *t*, *J*=8,7, H-2''), 3,78 (1H, *d*, *J*=12,1 Hz, H-6''), 3,65 (1H, *t*, *J*=8,9, H-3''), 3,60 (1H, *dd*, *J*=11,5 Hz, 5,4 Hz, H-5''), 3,41 (1H, *t*, *J*=9,3 Hz, H-4'').

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 177,77 (C-4), 166,28 (C-7'''), 164,46 (C-7), 161,75 (C-5), 160,02 (C-4'), 156,98 (C-9), 156,89 (C-2), 144,95 (C-3''' i C-5'''), 138,44 (C-4'''), 133,37 (C-3), 130,70 (C-2' i C-6'), 121,49 (C-1'), 120,15 (C-1'''), 114,79 (C-3' i C-5'), 109,16 (C-2''' i C-6'''), 104,45 (C-10), 99,05 (C-6), 98,36 (C-1''), 93,21 (C-8), 77,36 (C-5''), 74,98 (C-3''), 74,57 (C-2''), 70,28 (C-4''), 61,15 (C-6'').

Na osnovu UV-Vis, MS i ¹H, ¹³C i HMBC NMR spektara jedinjenje 2 identifikovano je kao astragalin-2''-O-galat (kemferol-3-O-(2''-O-galoil-β-D-glukozid)) (Slika 35). Dobijeni podaci su takođe bili u skladu sa literaturnim podacima (Ochir i sar., 2013; Samardžić i sar., 2018).



Slika 35. Jedinjenje 2

(astragalin-2''-galat; kemferol-3-O-(2''-O-galoil-β-D-glukozid))

2.3. Hemijski sastav metanolnih ekstrakata

Kvalitativni i kvantitativni sastav metanolnih ekstrakata podzemnih i nadzemnih delova ispitivanih vrsta utvrđen je primenom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS).

Identifikacija je izvršena poređenjem retencionih vremena, UV-Vis i masenih spektara razdvojenih jedinjenja sa odgovarajućim podacima za referentne supstance (komercijalni standardi i izolovana jedinjenja čija struktura je prethodno utvrđena), kao i sa odgovarajućim literaturnim podacima. U Tabeli 17 dati su UV-Vis i ESI-MS spektralni podaci jedinjenja prisutnih u ispitivanim ekstraktima, a za jedinjenja za koja nisu bile dostupne referentne supstance i čija je identifikacija izvršena poređenjem sa odgovarajućim literaturnim podacima, dati su i literaturni navodi.

Sadržaj jedinjenja u ekstraktima utvrđen je metodom kalibracione krive uz primenu eksternih standarda. Sadržaj je izražen u mg/g suvog ekstrakta i predstavlja srednju vrednost tri ponavljanja.

LC-MS analizom utvrđeno je da ispitivani ekstrakti sadrže fenolkarboksilne kiseline, tanine i flavonoidna jedinjenja.

Osim *G. robertianum* i *G. pyrenaicum*, ostale vrste do sada nisu detaljno ispitane u pogledu profila polifenolnih sastojaka, a posebno tanina.

Identifikovana jedinjenja kao i njihov sadržaj u ispitivanim ekstraktima dati su u Tabeli 18.

Tabela 17. UV-Vis i ESI-MS spektralni podaci jedinjenja prisutnih u ispitivanim ekstraktima

Jedinjenje	UV-Vis (λ_{max})	ESI-MS (m/z)	Literatura
galna kiselina	216, 272 nm	169 [M-H] ⁻ , 339 [2M-H] ⁻	Standard
elagna kiselina	254, 368 nm	301 [M-H] ⁻	Standard
galoilhina kiselina	216, 274 nm	343 [M-H] ⁻ , 191 [M-galoil ostatak] ⁻ , 169 [galna kiselina-H] ⁻	Catarino i sar, 2017 Clifford i sar, 2007 Świątek i sar., 2021
protokatehinska kiselina	260, 294 nm	153 [M-H] ⁻ , 109 [M-H-CO ₂] ⁻	Standard
galoilšikiminska kiselina	216, 276 nm	325 [M-H] ⁻ , 169 [galna kiselina-H] ⁻	Świątek i sar., 2021
hlorogenska kiselina	236, 326 nm	353 [M-H] ⁻ , 191 [hina kiselina-H] ⁻	Standard
brevifolin karboksilna kiselina	276, 356 nm	291 [M-H] ⁻ , 247 [M-H-CO ₂] ⁻	Catarino i sar, 2017 Wu i sar., 2012
kvercetin	254, 270sh, 370 nm	301 [M-H] ⁻	Standard
kvercetin-galoil-heksozid	258sh, 268, 360 nm	615 [M-H] ⁻ , 301 [M-galoilheksoza] ⁻	Świątek i sar., 2021
kvercetin-pentozid	256, 268sh, 354 nm	433 [M-H] ⁻ , 301 [M-pentozal] ⁻	Balázs i sar., 2011
kvercetin-pentozid	256, 270sh, 354 nm	433 [M-H] ⁻ , 301 [M-pentozal] ⁻	Balázs i sar., 2011
kvercetin-deoksiheksozid	258, 268sh, 348 nm	447 [M-H] ⁻ , 301 [M-deoksiheksoza] ⁻	Fang i sar., 2007

Jedinjenje	UV-Vis (λ_{max})	ESI-MS (m/z)	Literatura
hiperozid	256, 266sh, 354 nm	463 [M-H] ⁻ , 301 [M-galaktoza] ⁻	Standard
izokvercitrin	256, 266sh, 354 nm	463 [M-H] ⁻ , 301 [M-glukoza] ⁻	Standard
kemferol	266, 320sh, 366 nm	285 [M-H] ⁻	Standard
astragalin	264, 346 nm	447 [M-H] ⁻ , 285 [M-glukoza] ⁻	Standard
astragalin-2-galat	268, 296sh, 350 nm	599 [M-H] ⁻ , 285 [M-galoilglukoza] ⁻	Izolovano jedinjenje
kemferol-metiletar	266, 298sh, 344 nm	299 [M-H] ⁻ , 284 [M-H-CH ₃] ⁻	Falcão i sar., 2013
kemferol-dimetiletar	266, 296sh, 346 nm	313 [M-H] ⁻ , 283 [M-2H-2CH ₃] ⁻	Falcão i sar., 2013
geraniin	220, 276 nm	951 [M-H] ⁻ , 613 [M-H-HHDP] ⁻ , 301 [M-H-DHHDP-galoilglukoza] ⁻ , 169 [galna kiselina-H] ⁻	Standard
galoil-HHDP-DHHDP-glukoza, izomer geraniina	220, 276 nm	951 [M-H] ⁻ , 613 [M-H-HHDP] ⁻ , 301 [M-H-DHHDP-galoilglukoza] ⁻ , 169 [galna kiselina-H] ⁻	Catarino i sar, 2017
korilagin	220, 276 nm	633 [M-H] ⁻ , 463 [M-H-galna kiselina] ⁻ , 301 [M-H-galoilglukoza] ⁻	Izolovano jedinjenje
galoilglukoza	216, 278 nm	331 [M-H] ⁻ , 169 [M-H-glukoza] ⁻	Świątek i sar., 202; Zengin i sar., 2021
digaloilglukoza	216, 276 nm	483 [M-H] ⁻ , 313 [M-H-galna kiselina] ⁻ , 169 [M-H-glukoza] ⁻	Catarino i sar, 2017 Álvarez-Fernández i sar., 2015
trigaloilglukoza	216, 280 nm	635 [M-H] ⁻ , [M-2H] ²⁻	Graça i sar., 2017
pentagaloilglukoza	216, 278 nm	939 [M-H] ⁻ , 769 [M-H-galna kiselina] ⁻ , 169 [galna kiselina-H] ⁻	Graça i sar., 2017
telimagrandin I, anomer 1	216, 274 nm	785 [M-H] ⁻ , 392 [M-2H] ²⁻	Izolovano jedinjenje (Samardžić i sar., 2018)
telimagrandin I, anomer 2	218, 274 nm	785 [M-H] ⁻ , 392 [M-2H] ²⁻	Izolovano jedinjenje (Samardžić i sar., 2018)
digaloil-HHDP-glukoza, izomer 1	216, 274 nm	785 [M-H] ⁻ , 301 [M-H-digaloilglukoza] ⁻	Graça i sar., 2017
digaloil-HHDP-glukoza, izomer 2	216, 274 nm	785 [M-H] ⁻ , 301 [M-H-digaloilglukoza] ⁻	Graça i sar., 2017
telimagrandin 2	218, 280 nm	937 [M-H] ⁻ , 767 [M-H-galna kiselina] ⁻ , 468 [M-2H] ²⁻	Izolovano jedinjenje (Samardžić i sar., 2018)
hebulaginska kiselina	222, 276 nm	953 [M-H] ⁻ , 783 [M-H-galna kiselina] ⁻ , 476 [M-2H] ²⁻ , 301 [elagna kiselina-H] ⁻ , 169 [galna kiselina-H] ⁻	Tuominen i Salminen, 2017

Tabela 18. Hemijski sastav metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Geranium*

Jedinjenje	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta ± sd)															
	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. columbinum</i>		<i>G. lucidum</i>	
	n ^a	p ^b	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
Fenolkarboksilne kiseline i derivati																
galna kiselina	2,33±0,01	2,31±0,10	1,43±0,02	0,82±0,06	6,86±0,04	0,50±0,05	1,28±0,03	<LOQ ^c	<LOQ	-	3,79±0,07	<LOQ	3,67±0,07	<LOQ	<LOQ	0,92±0,06
elagna kiselina	10,26±0,05	3,20±0,09	9,08±0,07	6,39±0,47	2,03±0,05	3,91±0,08	10,14±0,09	-	7,42±0,05	-	7,09±0,03	1,36±0,02	9,14±0,02	-	21,25±0,15	4,15±0,72
galoilhina kiselina ^d	3,29±0,04	4,84±0,19	4,23±0,06	0,38±0,05	-	-	3,12±0,13	2,50±0,07	2,31±0,08	-	1,46±0,09	0,31±0,07	3,64±0,05	<LOQ	<LOQ	-
protokatehinska kiselina	2,86±0,02	-	3,88±0,08	3,78±0,44	-	-	-	-	3,37±0,01	-	4,40±0,01	<LOQ	1,87±0,32	-	-	-
galoilšikiminska kiselina ^d	-	-	-	-	-	-	8,99±0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hlorogenska kiselina	16,27±0,28	-	-	-	4,09±0,03	-	-	-	22,14±0,01	-	-	-	-	-	2,97±0,03	-
brevifolin karboksilna kiselina ^e	-	-	1,66±0,11	1,44±0,01	-	-	-	-	-	-	0,73±0,03	-	0,81 ±0,03	-	2,28 ±0,02	1,08±0,02
Flavonoidi i derivati																
kvercetin	2,87±0,01	-	6,47±0,04	-	-	-	<LOQ	-	-	-	-	-	<LOQ	-	2,25±0,00	-
kvercetin-galoil-heksozid ^f	-	-	-	-	-	-	-	-	3,73±0,00	-	1,64±0,02	-	-	-	-	-
kvercetin-pentozid ^f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,65±0,00	-	-	-
kvercetin-pentozid ^f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,28±0,01	-	-	-
kvercetin-deoksiheksozid ^f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,33±0,00	-	-	-
hiperozid ^f	2,16±0,01	-	-	-	-	-	<LOQ	-	<LOQ	-	4,99±0,01	-	-	-	-	-
izokvercitrin ^f	1,48±0,01	-	-	-	-	-	1,06±0,00	-	2,65±0,00	-	3,36±0,01	-	-	-	-	-

Jedinjenje	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta ± sd)															
	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. columbinum</i>		<i>G. lucidum</i>	
	n ^a	p ^b	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
kemferol	1,49±0,03	-	8,71±0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,00±0,01	-
astragalin ^g	-	-	-	-	-	-	-	-	1,63±0,00	-	2,20±0,00	-	-	-	-	-
astragalin-2''-O-galat	-	-	-	-	-	-	-	-	28,75±0,01	-	7,14±0,02	-	-	-	-	-
kemferol-metietar ^g	3,86±0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kemferol-dimetietar ^g	2,74±0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tanini																
geraniin	<LOQ	<LOQ	89,93±4,15	83,59±2,12	-	-	160,84±2,50	-	-	-	52,44±0,39	21,91±0,07	83,47±5,22	-	69,99±2,26	20,16±0,55
galoil-HHDP-DHHDP-glukoza, izomer geraniina ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	175,81±0,67	-	-	-	-	-	-	-
korilagin	22,05±0,15	-	30,08±0,43	12,93±0,67	-	-	65,31±1,09	-	76,76±1,40	-	44,42±0,29	<LOQ	47,12±4,93	-	17,20±0,65	6,75±0,05
galoilglukoza ^d	1,27±0,03	1,83±0,08	1,16±0,02	0,20±0,02	1,61±0,03	0,86±0,05	0,73±0,03	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,76±0,01	0,59±0,04	1,32±0,01	1,59±0,01	1,78±0,03	0,54±0,02
digaloilglukoza ^d	9,63±0,09	-	0,22±0,00	-	1,37±0,02	-	4,23±0,89	-	<LOQ	-	1,05±0,03	-	3,59±0,46	-	1,90±0,15	0,59±0,07
trigaloilglukoza ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,57±0,06
pentagaloilglukoza ^d	4,31±0,03	7,55±0,22	4,37±0,09	-	1,26±0,04	-	7,28±0,09	-	<LOQ	-	<LOQ	-	-	-	-	-
telimagrandin 1, anomer 1 ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,08±0,23	<LOQ	-	-	-	-
telimagrandin 1, anomer 2 ^d	5,18±0,04	13,52±0,22	-	-	-	-	-	-	-	-	22,23±0,33	<LOQ	-	-	-	-
digaloil-HHDP-glukoza, izomer 1 ^d	12,15±0,04	22,97±0,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<LOQ
digaloil-HHDP-glukoza, izomer 2 ^d	17,45±0,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Jedinjenje	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta ± sd)															
	<i>G. macorrhizum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. columbinum</i>		<i>G. lucidum</i>	
	n ^a	p ^b	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
digaloiil-HHDP-glukoza, izomer 3 ^d	7,99 ±0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
telimagrandin 2 ^d	-	-	-	-	10,61±0,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,87±0,03
hebulaginska ^d kiselina	-	-	-	-	-	-	-	-	22,70±0,16	-	5,46±0,11	-	-	-	-	-

^a Nadzemni delovi. ^b Podzemni delovi. ^c Količina manja od limita kvantifikacije. ^d Izraženo kao galna kiselina. ^e Izraženo kao elagna kiselina. ^f Izraženo kao kvercetin. ^g Izraženo kao kemferol. ^h Izraženo kao geraniin.

Fenolkarboksilne kiseline

U ispitivanim ekstraktima bile su zastupljene sledeće fenolkarboksilne kiseline: elagna, galna, galoilhina, galoilšikiminska, protokatehinska, hlorogenska i brevifolin karboksilna kiselina. Sadržaj pojedinih fenolkarboksilnih kiselina u ekstraktima bio je različit i kretao se u opsegu od <LOQ-22,14 mg/g suvog ekstrakta.

Galna, elagna i galoilhina kiselina bile su najčešće prisutne u ispitivanim ekstraktima.

Najzastupljenija fenolkarboksilna kiselina u većini ispitivanih ekstrakata, naročito nadzemnih delova, bila je elagna kiselina (1,36-21,25 mg/g). U najvećoj koncentraciji nalazila se u ekstraktima nadzemnih delova *G. lucidum* (21,25 mg/g), *G. macrorrhizum* (10,26 mg/g) i *G. sanguineum* (10,14 mg/g), dok u ekstraktima podzemnih delova *G. sanguineum*, *G. palustre* i *G. columbinum* nije detektovana.

Prethodna istraživanja pokazala da je elagna kiselina zastupljena u vrstama *G. macrorrhizum* (Miliauskas i sar., 2004; Fodorea i sar., 2004), *G. robertianum* (Fodorea i sar., 2005b; Grača i sar., 2016a; Catarino i sar., 2017), *G. sanguineum* (Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020) i *G. pyrenaicum* (Fodorea i sar., 2005a; Świątek i sar., 2021), dok je prisustvo ovog jedinjenja u vrstama *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. lucidum* i *G. columbinum* po prvi put utvrđeno u ovom radu. Inače, elagna kiselina nije genuini sastojak same biljke, već nastaje spontanom laktonizacijom heksahidroksidifenske kiseline (HHDP) koja se oslobađa nakon hidrolize elagnih tanina (Grača i sar., 2016b).

Hlorogenska kiselina bila je prisutna u ekstraktima nadzemnih delova četiri ispitivane vrste, pri čemu je visok sadržaj određen u ekstraktima nadzemnih delova *G. palustre* (22,14 mg/g) i *G. macrorrhizum* (16,27 mg/g), u kojima je bila i najzastupljenija fenolkarboksilna kiselina, dok su manje količine određene u ekstraktima nadzemnih delova *G. phaeum* (4,09 mg/g) i *G. lucidum* (2,97 mg/g). Dobijeni rezultati se uglavnom razlikuju od prethodnih prema kojima je hlorogenska kiselina prisutna u *G. robertianum* (Grača i sar., 2016a; Grača i sar., 2017; Nastić i sar., 2018), *G. sanguineum* (Leucuta i sar., 2005; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020) i *G. lucidum* (Salih, 2019), što je u ovom radu potvrđeno samo za *G. lucidum*. Sa druge strane, po prvi put je pokazano prisustvo i određen sadržaj hlorogenske kiseline u vrstama *G. palustre*, *G. macrorrhizum* i *G. phaeum*.

Galna kiselina nalazila se u svim ispitivanim uzorcima (<LOQ-6,86 mg/g), osim u ekstraktu podzemnog dela *G. palustre*, ali uglavnom u nižim koncentracijama u odnosu na elagnu i hlorogensku kiselinu. Najveće koncentracije određene su u ekstraktima nadzemnih delova *G. phaeum* (6,86 mg/g) gde je bila dominantna fenolkarboksilna kiselina, a zatim *G. pyrenaicum* (3,79 mg/g) i *G. columbinum* (3,67 mg/g). Sa izuzetkom *G. macrorrhizum* i *G. lucidum*, sadržaj galne kiseline bio je viši u nadzemnim u odnosu na podzemne delove.

Pored galne kiseline, u ispitivanim uzorcima utvrđeno je i prisustvo njenih depsida. Galoilhina kiselina detektovana je u svim ekstraktima (<LOQ-4,84 mg/g, izraženo kao galna kiselina) osim u ekstraktima *G. phaeum* i ekstraktima podzemnih delova *G. palustre* i *G. lucidum*. Najveći sadržaj ovog jedinjenja utvrđen je u ekstraktu podzemnog dela *G. macrorrhizum* (4,84 mg/g), gde je ujedno bila i najzastupljenija kiselina, a zatim u ekstraktima nadzemnih delova *G. robertianum* (4,23 mg/g) i *G. columbinum* (3,64 mg/g).

U literaturi postoje podaci o prisustvu galne i galoilhina kiseline u vrstama *G. macrorrhizum* (Miliauskas i sar., 2004), *G. robertianum* (Catarino i sar., 2017) i *G. pyrenaicum* (Świątek i sar., 2021).

Iako Świątek i sar. (2021) navode prisustvo galoilšikiminske kiseline u metanolnom ekstraktu nadzemnog dela *G. pyrenaicum*, pomenuto jedinjenje se u ovom ispitivanju nalazilo jedino u ekstraktu nadzemnog dela *G. sanguineum* (8,99 mg/g, izraženo kao galna kiselina).

Protokatehinska kiselina bila je zastupljena u ekstraktima nadzemnih delova *G. pyrenaicum* (4,40 mg/mL), *G. robertianum* (3,88 mg/g), *G. palustre* (3,37 mg/g), *G. macrorrhizum* (2,86 mg/g) i *G. columbinum* (1,87 mg/g), kao i u ekstraktima podzemnih delova *G. robertianum* (3,78 mg/g) i *G. pyrenaicum* (<LOQ). *Geranium macrorrhizum*

(Grigoraviciute i sar., 2018) i *G. robertianum* (Graća i sar., 2017; Nastić i sar., 2018) su jedine dve od vrsta ispitivanih u ovom radu u kojima je prethodno utvrđeno prisustvo ovog jedinjenja.

U svim ekstraktima *G. robertianum* (1,66 mg/g za ekstrakt nadzemnog i 1,44 mg/g za ekstrakt podzemnog dela, izraženo kao elagna kiselina) i *G. lucidum* (2,28 mg/g za ekstrakt nadzemnog i 1,08 mg/g za ekstrakt podzemnog dela) i ekstraktima nadzemnih delova *G. columbinum* (0,81 mg/g) i *G. pyrenaicum* (0,73 mg/g) bila je prisutna brevifolin karboksilna kiselina. Do sada je bilo poznato da je ova kiselina prisutna u vrstama *G. robertianum* i *G. pyrenaicum* (Catarino i sar., 2017; Świątek i sar., 2021), dok je njeno prisustvo po prvi put pokazano u vrstama *G. lucidum* i *G. columbinum*.

Ekstrakti nadzemnih organa bili su bogatiji fenolkarboksilnim kiselinama u odnosu na ekstrakte podzemnih organa, a najveći ukupan sadržaj određen je u ekstraktima nadzemnih delova *G. palustre* i *G. macrorrhizum* (35,24 mg/g i 35,01 mg/g, redom). Za ova dva ekstrakta utvrđena je sličnosti i u kvalitativnom sastavu fenolkarboksilnih kiselina. U oba ekstrakta bile su prisutne iste fenolkarboksilne kiseline (hlorogenska, galna, elagna, galoilhina i protokatehinska), pri čemu je hlorogenska kiselina bila najzastupljenija (22,14 mg/g i 16,27 mg/g, redom).

Jedino u ekstraktu podzemnog dela *G. palustre* nije detektovano prisustvo nijedne fenolkarboksilne kiseline.

Za razliku od prethodnih ispitivanja odabranih vrsta roda *Geranium*, u analiziranim uzorcima nije utvrđeno prisustvo drugih fenolkarboksilnih kiselina kao što su hina, 5-*O*-kafeoilhina, kumaroilhina, feruloilhina, kafeoilšikiminska, vanilinska, *p*-kumarna, rozmarinska, kafena, ferulinska, siringinska, salicilna, sinapinska, cihorijumska i gentizinska kiselina (Catarino i sar., 2017; Pantev i sar., 2006; Świątek i sar., 2021; Graća i sar., 2017; Grigoraviciute i sar., 2018; Leucuta i sar., 2005; Miliauskas i sar., 2004; Fodorea i sar., 2005a; Fodorea i sar., 2005b; Fodorea i sar., 2004; Abarova i sar., 2020; Salih, 2019).

Flavonoidna jedinjenja

U ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih vrsta, osim *G. phaeum*, utvrđeno je prisustvo i određen sadržaj flavonolnih aglikona kvercetina, kemferola i metilovanih derivata kemferola, heterozida kvercetina i kemferola kao i galoilovanih derivata heterozida kvercetina i kemferola.

U ekstraktima podzemnih organa nisu bila prisutna flavonoidna jedinjenja.

Sadržaj flavonoidnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima bio je različit i kretao se u opsegu 1,06-28,75 mg/g suvog ekstrakta.

Sadržaj slobodnih aglikona, kemferola i kvercetina određen je u ekstraktima nadzemnih delova *G. robertianum* (8,71 i 6,47 mg/g, redom), *G. lucidum* (7,00 i 2,25 mg/g redom), gde su bili dominani flavonoidi, kao i u *G. macrorrhizum* (1,49 mg/g i 2,87 mg/g, redom). Pored toga, kvercetin je detektovan (<LOQ) i u ekstraktima nadzemnih delova *G. sanguineum* i *G. columbinum*.

U prethodnim istraživanjima, kvercetin je identifikovan u vrstama *G. macrorrhizum* (Grigoraviciute i sar., 2018; Miliauskas i sar., 2004;), *G. robertianum* (Paun i sar., 2011), *G. sanguineum* (Leucuta i sar., 2005; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020; Ivancheva i Petrova, 2000), *G. pyrenaicum* (Świątek i sar., 2021) i *G. columbinum* (Ivancheva i Petrova, 2000). Sadržaj kvercetina prethodno je određen u *G. sanguineum* (0,82 mg/g suve herbe) (Leucuta i sar., 2005). U ovom radu nije detektovan kvercetin u ekstraktu nadzemnog dela *G. pyrenaicum*, ali je po prvi put utvrđeno prisustvo i određen sadržaj ovog jedinjenja u ekstraktu nadzemnog dela *G. lucidum*.

Literaturni podaci navode da je kemferol zastupljen u vrstama *G. macrorrhizum* (Grigoraviciute i sar., 2018; Fodorea i sar., 2004), *G. robertianum* (Paun i sar., 2014; Ivancheva i Petrova, 2000;), *G. sanguineum* (Pantev i sar., 2006; Leucuta i sar., 2005; Ivancheva i Petrova,

2000), *G. pyrenaicum* (Ivancheva i Petrova, 2000) i *G. columbinum* (Ivancheva i Petrova, 2000). U prethodnim ispitivanjima, sadržaj kemferola u herbi *G. macrorrhizum* iznosio je 9,92 µg/100 mg suve herbe (Fodorea i sar., 2004), dok je u ekstraktu nadzemnog dela *G. sanguineum* bio zastupljen u koncentraciji od 0,19 mg/g (Leucuta i sar., 2005). U ovom istraživanju, kemferol nije pronađen u ekstraktima *G. pyrenaicum*, ali je sa druge strane po prvi put detektovan i određen je njegov sadržaj u nadzemnom delu *G. lucidum*.

Pored slobodnih aglikona, u pojedinim ekstraktima utvrđeno je i prisustvo heterozida kvercetina i kemferola, i to hiperozida (kvercetin-3-*O*-galaktozid), izokvercitrina (kvercetin-3-*O*-glukozid) i astragalina (kemferol-3-*O*-glukozid).

Hiperozid i izokvercitrin nalazili su se u ekstraktima nadzemnih delova *G. pyrenaicum* u količinama od 4,99 mg/g i 3,36 mg/g, redom (izraženo kao kvercetin), *G. macrorrhizum* (2,16 mg/g i 1,48 mg/g, redom), *G. palustre* (<LOQ i 2,65 mg/g, redom) i *G. sanguineum* (<LOQ i 1,06 mg/g, redom). Astragalin je bio zastupljen u ekstraktima nadzemnih delova *G. palustre* (1,63 mg/g, izraženo kao kemferol) i *G. pyrenaicum* (2,20 mg/g).

U literaturi postoje podaci o zastupljenosti hiperozida u vrstama *G. macrorrhizum* (Miliauskas i sar., 2004; Fodorea i sar., 2004), *G. robertianum* (Fodorea i sar., 2005b), *G. sanguineum* (Leucuta i sar., 2005; Ivancheva i Petrova, 2000; Pantev i sar., 2006; Abarova i sar., 2020) i *G. pyrenaicum* (Fodorea i sar., 2005a). Iako se hiperozid navodi kao flavonolni heterozid prisutan u *G. robertianum*, u našem istraživanju to nije potvrđeno, ali je po prvi put utvrđeno prisustvo ovog jedinjenja u nadzemnom delu *G. palustre*.

Izokvercitrin je prema dostupnim podacima identifikovan u vrstama *G. macrorrhizum* (Miliauskas i sar., 2004; Fodorea i sar., 2004; Ivancheva i Petrova, 2000), *G. robertianum* (Fodorea i sar., 2005b; Grača i sar., 2016a; Grača i sar., 2017; Ivancheva i Petrova, 2000), *G. palustre* (Ivancheva i Petrova, 2000), *G. sanguineum* (Leucuta i sar., 2005), *G. pyrenaicum* (Fodorea i sar., 2005a; Ivancheva i Petrova, 2000) i *G. lucidum* (Ivancheva i Petrova, 2000). U ovom radu nije utvrđeno prisustvo izokvercitrina u ekstraktima *G. robertianum* i *G. lucidum*.

Za razliku od istraživanja Kartnig i Bucar-Stachel (1991), astragalin nije detektovan u ekstraktu nadzemnog dela *G. robertianum*. Sa druge strane, dobijeni rezultati o prisustvu astragalina u ekstraktima nadzemnih delova *G. palustre* i *G. pyrenaicum* su u skladu sa literaturnim podacima (Ivancheva i Petrova, 2000; Świątek i sar., 2021).

Za ekstrakte nadzemnih delova *G. palustre* i *G. pyrenaicum* bilo je karakteristično prisustvo galoilovanih heterozida kemferola i kvercetina i to astragalin-2''-*O*-galata (28,75 mg/g i 7,14 mg/g, redom) i kvercetin-galoilheksozida (3,73 mg/g i 1,64 mg/g, redom, izraženo kao kvercetin). Astragalin-2''-*O*-galat je od svih flavonoidnih jedinjenja bio zastupljen u najvećoj količini od 28,75 mg/g i to u ekstraktu nadzemnog dela *G. palustre*. Navedena jedinjenja nisu detektovana ni u jednom drugom analiziranom uzorku, što ukazuje na izvesnu sličnost u hemijskom sastavu između ove dve vrste. Dobijeni rezultati potvrđuju literaturne podatke o prisustvu galoilovanih glukozida kemferola i kvercetina u nadzemnim delovima *G. pyrenaicum* (Świątek i sar., 2021). Zastupljenost ovih jedinjenja u nadzemnim delovima *G. palustre* je po prvi put pokazana u ovom istraživanju.

Ekstrakt nadzemnog dela *G. columbinum* razlikovao se od ostalih po prisustvu dva pentozida kvercetina (1,65 mg/g i 6,28 mg/g, izraženo kao kvercetin) i deoksiheksozida kvercetina (5,33 mg/g, izraženo kao kvercetin), koji su po prvi put detektivani i određeni u *G. columbinum* u ovom radu.

Metilovani derivati kemferola bili su prisutni samo u ekstraktu nadzemnog dela *G. macrorrhizum*, i to kemferol-metiletar (3,86 mg/g, izraženo kao kemferol) i kemferol-dimetiletar (2,74 mg/g).

Vrste roda *Geranium* karakterišu se prisustvom žlezdanih trihoma pre svega na listovima u kojima se pored terpenskih jedinjenja, nalaze i flavonoidi, i to metilovani derivati flavonola. Ivancheva i Petrova (2000) navode prisustvo mono-, di-, tri- i tetrametil derivata kemferola, kvercetina i miricetina u ekstraktima dobijenim ispiranjem listova različitih vrsta ovog roda acetonom. Najveći broj metilovanih flavonoida identifikovan je u ekstraktima

G. macrorrhizum i *G. lucidum*. Sa druge strane, prisustvo ovih jedinjenja nije uočeno u vrstama *G. phaeum* i *G. columbinum* (Ivancheva i Petrova, 2000; Abarova i sar., 2020; Harborn i Williams, 2002). Manja zastupljenost metilovanih derivata u ispitivanim ekstraktima u odnosu na literaturne podatke može se objasniti pre svega različitom polarnošću rastvarača koji su korišteni za ekstrakciju kao i različitim postupcima ekstrakcije.

U pogledu sadržaja flavonoida od ispitivanih vrsta ističu se nadzemni delovi *G. macrorrhizum*, *G. palustre* i *G. pyrenaicum*. Najveći broj flavonoidnih jedinjenja utvrđen je u ekstraktu nadzemnog dela *G. macrorrhizum*, koji je jedini sadržao metilovane derivate kemferola. Ekstrakti nadzemnih delova *G. palustre* i *G. pyrenaicum* su ispoljili sličnosti u sastavu flavonoidnih jedinjenja. U obe vrste bili su prisutni hiperozid, izokvercitrin i astragalin, ali i galoilovani derivati (kvercetin-galoilheksozid i astragalin-2''-*O*-galat) po kojima se navedene vrste razlikuju od svih ostalih. Sličan profil u pogledu prisustva flavonoida pokazali su i ekstrakti nadzemnih delova *G. robertianum* i *G. lucidum* u kojima su bili dominantni kvercetin i kemferol.

Tanini

LC-MS analizom u ispitivanim ekstraktima utvrđeno je prisustvo i određen sadržaj elagnih tanina: geraniina i njegovog izomera, korilagina, telimagrandina I i jedinjenja izomerne strukture, telimagrandina II i hebulaginske kiseline. Pored elagnih, identifikovani su i određen je sadržaj galnih tanina i to: galoilglukoze, digaloilglukoze, trigaloilglukoze i pentagaloilglukoze.

U većini analiziranih uzoraka kao dominantni među svim polifenolnim sastojcima izdvojili su se elagni tanini. Geraniin je određen u značajnim količinama i bio je dominantno jedinjenje u ekstraktima nadzemnih delova *G. sanguineum* (160,84 mg/g), *G. robertianum* (89,93 mg/g), *G. columbinum* (83,47 mg/g), *G. lucidum* (69,99 mg/g) i *G. pyrenaicum* (52,44 mg/g), kao i u ekstraktima podzemnih delova *G. robertianum* (83,59 mg/g), *G. pyrenaicum* (21,91 mg/g) i *G. lucidum* (20,16 mg/g). Uglavnom je bio prisutan u većim količinama u ekstraktima nadzemnih u odnosu na ekstrakte podzemnih delova, sa izuzetkom *G. robertianum* gde je njegov sadržaj u oba ekstrakta bio sličan. U tragovima (<LOQ) je bio prisutan u ekstraktima *G. macrorrhizum*, dok nije detektovan u ekstraktima *G. phaeum* i *G. palustre* i ekstraktima podzemnih delova *G. sanguineum* i *G. columbinum*. Od ispitivanih vrsta, jedino za *G. robertianum* i *G. pyrenaicum* postoje podaci o sadržaju geraniina i njegovih izomera (Grača i sar., 2016a; Grača i sar., 2017; Catarino i sar., 2017; Świątek i sar., 2021).

U ekstraktu nadzemnog dela *G. palustre*, za razliku od svih ostalih uzoraka, utvrđena je značajna količina (175,81 mg/g, izraženo kao geraniin) galoil-HHDP-DHHDP-glukoze, jedinjenja koje se može smatrati izomerom geraniina.

Sledeći po zastupljenosti bio je korilagin. U značajnim količinama (17,20-76,76 mg/g) nalazio se u svim ekstraktima nadzemnih delova sa izuzetkom ekstrakta *G. phaeum* u kome nije detektovan. Najveći sadržaj ovog jedinjenja određen je u ekstraktima nadzemnih delova *G. palustre* (76,76 mg/g), *G. sanguineum* (65,31 mg/g), *G. columbinum* (47,12 mg/g), *G. pyrenaicum* (44,42 mg/g), *G. robertianum* (30,08 mg/g), *G. macrorrhizum* (22,05 mg/g) i *G. lucidum* (17,20 mg/g). U nešto manjim količinama nalazio se u ekstraktima podzemnih delova, i to *G. robertianum* (12,93 mg/g) i *G. lucidum* (6,75 mg/g), kao i u ekstraktu *G. pyrenaicum* (<LOQ). Catarino i sar. (2017) navode prisustvo korilagina u nadzemnom delu *G. robertianum*. Świątek i sar. (2021) navode prisustvo jedinjenja korilaginske strukture (galoil-HHDP-glukoza) u ekstraktu nadzemnog dela *G. pyrenaicum*. U ovom radu, po prvi put je utvrđeno prisustvo i određen sadržaj korilagina u nadzemnim delovima *G. palustre*, *G. sanguineum*, *G. columbinum*, *G. macrorrhizum* i *G. lucidum* kao i u podzemnim delovima *G. robertianum*, *G. lucidum* i *G. pyrenaicum*.

U pojedinim ekstraktima nalazili su se i elagni tanini telimagrandin I i II. Prisustvo oba anomera telimagrandina I utvrđeno je u ekstraktu nadzemnog (7,08 i 22,23 mg/g, izraženo kao galna kiselina) i podzemnog dela *G. pyrenaicum* (<LOQ). Telimagrandin I anomer 2 bio je prisutan i u ekstraktima *G. macrorrhizum* (5,18 mg/g ekstrakta nadzemnog i 13,52 mg/g ekstrakta podzemnog dela). Telimagrandin II bio je zastupljen samo u ekstraktima nadzemnog dela *G. phaeum* (10,61 mg/g, izraženo kao galna kiselina) i podzemnog dela *G. lucidum* (6,87 mg/g). Catarino i sar. (2017) navode prisustvo istog ili sličnog jedinjenja u *G. robertianum*.

U ekstraktima *G. macrorrhizum* utvrđeno je i prisustvo tri izomera digaloil-HHDP-glukoze, jedinjenja strukturno sličnih telimagrandinu I. Prvi izomer bio je prisutan u ekstraktima nadzemnog (12,15 mg/g, izraženo kao galna kiselina) i podzemnog dela (22,97 mg/g) *G. macrorrhizum*, a detektovan je (<LOQ) i u ekstraktu podzemnog dela *G. lucidum*. Druga dva izomera nalazila su se jedino u ekstraktu nadzemnog dela *G. macrorrhizum* (17,45 mg/g i 7,99 mg/g, redom). Izomeri digaloil-HHDP-glukoze su u prethodnim istraživanjima identifikovani u vrstama *G. robertianum* i *G. pyrenaicum* (Grača i sar., 2016a; Grača i sar., 2017; Świątek i sar., 2021).

Iz grupe elagnih tanina, identifikovano je i prisustvo hebulaginske kiseline, i to samo u ekstraktima nadzemnih delova *G. palustre* (22,70 mg/g, izraženo kao galna kiselina) i *G. pyrenaicum* (5,46 mg/g), što dodatno ukazuje na sličnosti u hemijskom sastavu nadzemnih delova ove dve vrste.

U svim analiziranim uzorcima utvrđeno je prisustvo galoil derivata glukoze. Monogaloilglukoza bila je prisutna u svim ekstraktima (<LOQ-1,83 mg/g, izraženo kao galna kiselina). Ekstrakti nadzemnih organa svih ispitivanih vrsta sadržali su digaloilglukozu (<LOQ-9,63 mg/g), kao i ekstrakt podzemnog dela *G. lucidum* (0,59 mg/g). *Geranium macrorrhizum*, *G. sanguineum* i *G. columbinum* su vrste sa najvišim sadržajem ovog jedinjenja u ekstraktima nadzemnih delova (9,63 mg/g, 4,23 mg/g i 3,59 mg/g, redom). Trigaloilglukoza bila je zastupljena jedino u ekstraktu podzemnog dela *G. lucidum* (3,57 mg/g). Prisustvo pentagaloilglukoze utvrđeno je u ekstraktu podzemnog organa *G. macrorrhizum* (7,55 mg/g) i ekstraktima nadzemnih delova *G. sanguineum* (7,28 mg/g), *G. robertianum* (4,37 mg/g), *G. macrorrhizum* (4,31 mg/g) i *G. phaeum* (1,26 mg/g), kao i u ekstraktima nadzemnih delova *G. palustre* i *G. pyrenaicum* (<LOQ). Literaturni podaci pokazuju da su galoilovani derivati heksoza zastupljeni u vrstama *G. macrorrhizum*, *G. robertianum* i *G. pyrenaicum* (Grigoraviciute i sar., 2018; Catarino i sar., 2017; Grača i sar., 2016a; Grača i sar., 2017; Świątek i sar., 2021).

Najveći broj različitih tanina identifikovan je u ekstraktima nadzemnih delova *G. macrorrhizum* i *G. pyrenaicum*. Odsustvo jednog anomera telimagrandina I i hebulaginske kiseline, kao i prisustvo tri izomera digaloil-HHDP-glukoze i značajno niži sadržaj geraniina razlikovao je ekstrakt *G. macrorrhizum* od ekstrakta *G. pyrenaicum*.

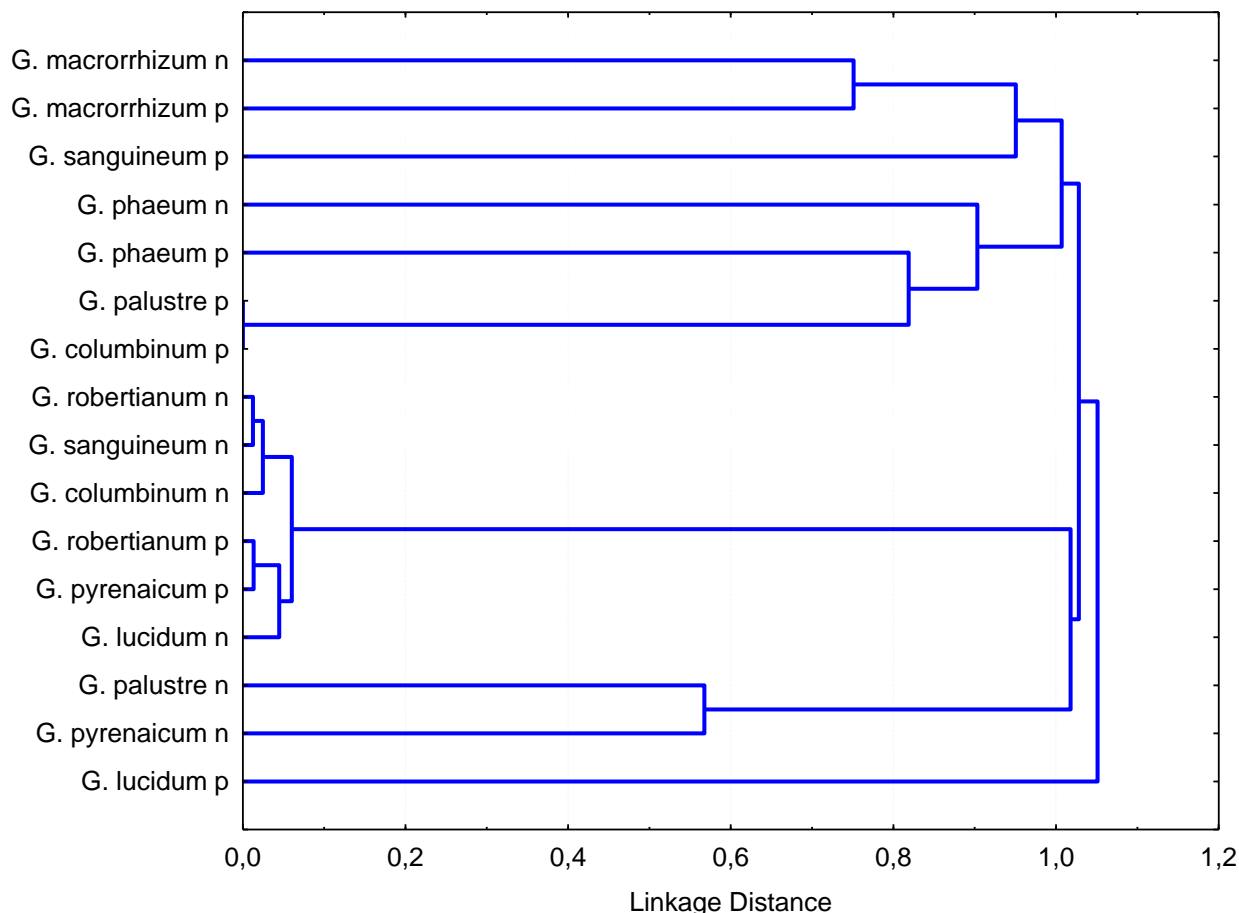
Generalno, u ekstraktima nadzemnih delova *G. robertianum*, *G. sanguineum*, *G. pyrenaicum*, *G. columbinum* i *G. lucidum*, kao i u ekstraktu podzemnog dela *G. robertianum* geraniin i korilagin su bili dominantni tanini. U ekstraktima nadzemnog dela *G. phaeum* i podzemnog dela *G. lucidum* je, pored ova dva jedinjenja, bio prisutan i telimagrandin II. Ekstrakt nadzemnog dela *G. palustre* je, za razliku od svih ostalih ekstrakata, sadržao izomer geraniina. Oba anomera telimagrandina I bila su prisutna istovremeno jedino u ekstraktima *G. pyrenaicum*. Prisustvo hebulaginske kiseline uočeno je samo u ekstraktima nadzemnih delova *G. palustre* i *G. pyrenaicum*.

Statistička klaster analiza

Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize metanolnih ekstrakata podzemnih i nadzemnih organa ispitivanih vrsta statistički su obrađeni primenom UPGMA (*Unweighted*

Pair-Group Arithmetic Averages clustering) metode. Klaster analiza uključivala je sadržaj svih polifenolnih jedinjenja prisutnih u ispitivanim ekstraktima.

Na dobijenom dendrogramu (Slika 36) može se uočiti da su se ispitivani uzorci grupisali u dve velike grupe uz odvajanje ekstrakta podzemnog dela *G. lucidum* od svih ostalih ispitivanih uzoraka na osnovu prisustva trigaloil-glukoze.



Slika 36. Klaster analiza polifenolnih sastojaka ekstrakata *Geranium* vrsta na osnovu *Pearson*-ovih distanci u UPGMA metodi spajanja

U okviru prve grupe izvršeno je grupisanje ekstrakata nadzemnog i podzemnog dela *G. macrorrhizum* i podzemnog dela *G. sanguineum* u jednu i ekstrakata nadzemnog i podzemnog dela *G. phaeum* i podzemnih delova *G. palustre* i *G. columbinum* u drugu podgrupu. Ekstrakti *G. macrorrhizum* se od ekstrakta podzemnog dela *G. sanguineum* razlikuju po značajno većem sadržaju tanina i fenolkarboksilnih kiselina. Za razliku od ekstrakta podzemnog dela, ekstrakt nadzemnog dela *G. macrorrhizum* je sadržao flavonoide. U drugoj podgrupi odvojio se ekstrakt nadzemnog dela *G. phaeum* usled višeg sadržaja tanina. Nakon toga došlo je do odvajanja ekstrakta podzemnog dela *G. phaeum* od ekstrakata podzemnih delova *G. palustre* i *G. columbinum* na osnovu sadržaja galne i elagne kiselina. Razlika između ekstrakata podzemnih delova *G. palustre* i *G. columbinum* potiče od većeg sadržaja galoilglukoze i prisustva galne i galoilhina kiseline u tragovima.

U okviru druge grupe izdvojili su se, međusobno hemijski slični, ekstrakti nadzemnih delova *G. palustre* i *G. pyrenaicum*, a usled prisustva astragalina, galoilovanih derivata astragalina i heterozida kvercetina, kao i hebulaginske kiseline. Razlika između ova dva ekstrakta ogleda se u prisustvu hlorogenske kiseline i izomera geraniina u ekstraktu *G. palustre*, odnosno brevifolin karboksilne kiseline, geraniina i anomera telimagrandina I u ekstraktu

G. pyrenaicum. Ostatak grupe podeljen je na dve podrupe usled razlika u sadržaju tanina pri čemu su u jednoj bili ekstrakti nadzemnih delova *G. robertianum*, *G. sanguineum* i *G. columbinum*, a u drugoj ekstrakti podzemnih delova *G. robertianum* i *G. pyrenaicum* i nadzemnog dela *G. lucidum*. Ekstrakt nadzemnog dela *G. columbinum* razlikovao se od ostalih ekstrakata prve podgrupe po prisustvu dva pentozida i deoksiheksozida kvercetina. Razlika između ekstrakata nadzemnih delova *G. robertianum* i *G. sanguineum* ogleda se u prisustvu protokatehinske i brevifolin karboksilne kiseline i kemferola u prvom, odnosno galoilšikiminske kiseline, hiperozida i izokvercitrina u drugom ekstraktu. U drugoj podgrupi odvojio se ekstrakt nadzemnog dela *G. lucidum* zbog prisustva flavonolnih aglikona kvercetina i kemferola i hlorogenske kiseline. Ekstrakti podzemnih delova *G. robertianum* i *G. pyrenaicum* razlikuju se u prisustvu brevifolin karboksilne kiseline u prvom, odnosno anomera telimagrandina I u drugom.

Izvesna sličnost u sastavu i količini polifenolnih sastojaka se može uočiti u ekstraktima nadzemnih delova *G. robertianum*, *G. sanguineum* i *G. columbinum*, u ekstraktima podzemnih delova *G. robertianum* i *G. pyreneicum* i ekstraktu nadzemnog dela *G. lucidum* u kojima je određen visok sadržaja geraniina. Iako je geraniin prisutan u značajnoj količini i u ekstraktu nadzemnih delova *G. pyreneicum*, navedeni ekstrakt je grupisan sa ekstraktom nadzemnog dela *G. palustre* zbog sadržaja flavonoida (kvercetin-galoil-heksozid, astragalin i astragalin-galat) koji u ostalim ekstraktim nisu bili prisutni.

3. Farmakološka aktivnost metanolnih ekstrakata

U cilju farmakološke karakterizacije, metanolni ekstrakti ispitani su u pogledu antioksidantne, antimikrobne i citotoksične aktivnosti.

3.1. Antioksidantna aktivnost

Oksidativni stres predstavlja stanje neravnoteže između pro- i antioksidantnih agenasa i nastaje kao posledica prekomerne produkcije reaktivnih jedinjenja i/ili smanjenih antioksidantnih kapaciteta. Reaktivna jedinjenja obuhvataju kiseonične, azotne i sumporne slobodne radikale i oksidanse. Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali, a u organizmu nastaju tokom metaboličkih procesa ili pod uticajem spoljašnjih faktora kao što su zračenje, ozon, duvanski dim, zagađenje i dr. (Bagchi i Puri, 1998).

Iako organizam poseduje endogeni antioksidantni sistem koji se sastoji od enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaza i glutation reduktaze, peroksidaze i transferaze, često produkcija ovih reaktivnih jedinjenja prevazilazi antioksidantne kapacitete te u organizmu dolazi do oštećenja nukleinskih kiselina, lipida i proteina. Hidroksilni radikal ima sposobnost reagovanja sa svim gradivnim jedinicama molekula DNK oštećujući pritom i purinske i pirimidinske baze, kao i dezoksiribozu (Halliwell i Gutteridge, 1999). Oksidativno oštećenje genetskog materijala predstavlja početnu tačku mutageneze, karcinogeneze i starenja. Dalje, slobodni radikali dovode do lipidne peroksidacije i nastanka toksičnih proizvoda malonildialdehida, 4-hidroksi-2-nonenala i F2-izoprostana (Mas-Bargues i sar., 2021). Pod uticajem slobodnih radikala može doći do oštećenja proteina usled oksidativne modifikacije specifične aminokiseline, cepanja peptida ili formiranja transverzalno vezujućih proteina (Lobo i sar., 2010).

Smatra se da oksidativni stres ima ulogu u patogenezi različitih kardiovaskularnih, neurodegenerativnih, metaboličkih i autoimunih bolesti (Carocho i sar., 2018). Sa druge strane, u određenim stanjima reaktivna jedinjenja mogu imati korisne efekte. Istraživanja poslednjih godina pokazuju da reaktivne kiseonične vrste mogu potencirati efikasnost antikancerske terapije (Kim i sar., 2019). Takođe, ova jedinjenja imaju ulogu u imunološkoj odbrani organizma (Herb i sar., 2021).

Antioksidantni potencijal metanolnih ekstrakata nadzemnih i podzemih organa ispitivanih vrsta utvrđen je *in vitro* testovima. Ukupna antioksidantna aktivnost ispitana je u FRAP testu, dok je antiradikalska aktivnost procenjena DPPH testom. Takođe antioksidantni potencijal ekstrakata procenjen je ispitivanjem njihovog uticaja na parametre oksidativnog stresa u humanom serumu.

3.1.1. FRAP test

Ukupna antioksidantna aktivnost ekstrakata, odnosno njihova redukciona sposobnost, procenjena je na osnovu njihove sposobnosti da redukuju Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-*s*-triazin kompleks.

U Tabeli 19 prikazani su rezultati određivanja ukupne antioksidantne aktivnosti ispitivanih ekstrakata i L-askorbinske kiseline kao jedinjenja koje ima potvrđenu antioksidantnu aktivnost. Rezultati su izraženi kao FRAP vrednost (broj mmol Fe^{2+} jona koji ima istu

redukcionu sposobnost kao 1 g suvog metanolnog ekstrakta) i predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

U pogledu ukupne antioksidantne aktivnosti, između ispitivanih ekstrakata i L-askorbinske kiseline nije uočena statistički značajna razlika što ukazuje na izražen antioksidantni potencijal ekstrakata. Dobijene FRAP vrednost bile su u opsegu 1,13-8,80 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta.

Kao što je i očekivano, ekstrakti podzemnih delova *G. palustre* i *G. phaeum*, koji su imali najviši sadržaj ukupnih polifenola, ispoljili su najveću redukcionu sposobnost, odnosno za njih su zabeležene najviše FRAP vrednosti (8,80 i 7,02 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta), koje su bile više od FRAP vrednosti za L-askorbinsku kiselinu (6,55 mmol Fe²⁺/g).

Visoku ukupnu antioksidantnu aktivnost, sličnu aktivnosti L-askorbinske kiseline, pokazali su i ekstrakti nadzemnih delova *G. palustre* (6,64 mmol Fe²⁺/g) i *G. sanguineum* (6,32 mmol Fe²⁺/g), kao i ekstrakt podzemnog dela *G. macrorrhizum* (6,33 mmol Fe²⁺/g). Sa druge strane, ekstrakt nadzemnog dela *G. phaeum* pokazao je najmanju aktivnost (1,13 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta), što je u skladu sa najnižim sadržajem ukupnih polifenola u ovom ekstraktu.

3.1.2. DPPH test

Visok sadržaj polifenolnih jedinjenja i naglašena redukciona sposobnost utvrđena u FRAP testu ukazali su i na potencijalno značajnu antiradikalnu aktivnost ekstrakata, što je i potvrđeno u DPPH testu.

Rezultati dobijeni u DPPH testu za ispitivane ekstrakte izraženi su kao IC₅₀ vrednost, koja predstavlja koncentraciju ekstrakta/pozitivne kontrole koja neutrališe 50% DPPH radikala. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja (Tabela 19).

Svi ekstrakti ispoljili su koncentraciono zavisnu anti-DPPH aktivnost ($r^2 = 0,9902-0,999$) sa IC₅₀ vrednostima u opsegu od 4,24-34,52 µg/mL. Dobijene vrednosti statistički su bile uporedive sa aktivnošću L-askorbinske kiseline (IC₅₀=3,68µg/mL) i ukazuju na visoku sposobnost ekstrakata za uklanjanje DPPH radikala, osim za ekstrakte nadzemnog dela *G. phaeum* (IC₅₀= 34,52 µg/mL) i podzemnog dela *G. columbinum* (IC₅₀=10,45 µg/mL).

Najjača sposobnost neutralizacije DPPH radikala utvrđena je za ekstrakte podzemnog i nadzemnog dela *G. palustre* (IC₅₀=4,24 µg/mL i IC₅₀=4,34 µg/mL, redom), što je u skladu sa visokim sadržajem polifenolnih jedinjenja i visokom redukcionom sposobnošću utvrđenom u FRAP testu. Značajna antiradikalna aktivnost zabeležena je i za oba ekstrakta *G. macrorrhizum* (IC₅₀=4,92 za ekstrakt nadzemnog i IC₅₀=5,34 µg/mL za ekstrakt podzemnog dela), ekstrakt podzemnog dela *G. phaeum* (IC₅₀=5,18 µg/mL) i ekstrakt nadzemnog dela *G. sanguineum* (IC₅₀=5,18 µg/mL), što je takođe u skladu sa sadržajem ukupnih polifenola i rezultatima FRAP testa. Analogno rezultatima FRAP testa, ekstrakt nadzemnog dela *G. phaeum* pokazao je najnižu antiradikalnu aktivnost (IC₅₀=34,52 µg/mL).

Tabela 19. Antioksidantna aktivnost metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta i L-askorbinske kiseline

Ekstrakt		FRAP vrednost ^a (mmol Fe ²⁺ /g)	DPPH IC ₅₀ ^b (µg/mL)
<i>G. macrorrhizum</i>	n ^c	5,68±0,10	4,92±0,21
	p ^d	6,33±0,02	5,34±0,11
<i>G. robertianum</i>	n	5,30±0,23	6,81±0,16
	p	4,92±0,14	7,54±0,07
<i>G. phaeum</i>	n	1,13±0,03	34,52±0,91
	p	7,02±0,17	5,18±0,06
<i>G. sanguineum</i>	n	6,32±0,19	5,18±0,04
	p	5,85±0,18	5,80±0,03
<i>G. palustre</i>	n	6,64±0,24	4,34±0,09
	p	8,80±0,09	4,24±0,05
<i>G. pyrenaicum</i>	n	3,31±0,12	9,20±0,04
	p	3,15±0,18	9,15±0,23
<i>G. lucidum</i>	n	4,93±0,02	7,76±0,24
	p	5,19±0,25	5,74±0,10
<i>G. columbinum</i>	n	4,03±0,06	10,33±0,31
	p	3,88±0,13	10,45±0,32
L-askorbinska kiselina		6,55±0,04	3,68±0,05

^a Broj mmol Fe²⁺ jona koji ima istu redukciju sposobnost kao 1 g suvog metanolnog ekstrakta, izraženo kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD. ^b koncentracija ekstrakta/pozitivne kontrole koja neutrališe 50% DPPH radikala, izraženo kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD. ^c Nadzemni delovi. ^d Podzemni delovi.

3.1.3. Uticaj na parametre oksidativnog stresa

Antioksidantna aktivnost ekstrakata ispitana je i *in vitro* u humanom serumu nakon indukovanja oksidativnog stresa *tert*-butilhidroperoksidom (TBH) i upoređena sa poznatim antioksidansom, hidrosolubilnim analogom vitamina E (troloks).

Upotreba humanog seruma kao medijuma za ispitivanje antioksidantne aktivnosti obezbeđuje uslove slične fiziološkim uslovima u sistemskoj cirkulaciji, a takođe uzima u obzir i potencijalne uticaje fiziološki relevantne sredine na ispitivane uzorke (na primer vezivanje za proteine seruma ili interakcija sa drugim biomolekulima prisutnim u serumu).

Ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata *Geranium* vrsta na ovaj način je po prvi put urađeno u ovoj doktorskoj disertaciji.

Aktivnost ekstrakata je procenjena određivanjem njihovog uticaja na parametre oksidativnog stresa u serumu, i to na: totalni antioksidantni kapacitet (TAK), totalni oksidantni potencijal (TOP), prooksidantno-antioksidantni balans (PAB) i sadržaj sulfhidrilnih grupa (SHG). Na osnovu dobijenih vrednosti ovih parametara izračunat je Oksi skor (OS), čije su vrednosti, izražene u vidu medijana i percentila, prikazane u Tabeli 20.

Vrednosti OS dobijene su računanjem antioksidantnih (TOP i PAB) i prooksidantnih parametara (TAK i SHG), što je od značaja kada se uzme u obzir mogućnost prooksidantnog delovanja polifenolnih jedinjenja. Naime, istraživanja poslednjih godina ukazuju da i antioksidansi mogu ispoljiti prooksidantno delovanje pri visokim koncentracijama, u baznoj sredini i/ili u prisustvu jona metala (Blokina i sar., 2003; Zhou i Elias, 2013). Smatra se da prooksidantna aktivnost fenolnih jedinjenja, između ostalog, potiče od njihove sposobnosti da redukuju jone metala kao što su Cu^{2+} i Fe^{3+} do Cu^+ i Fe^{2+} koji u Fentonovoj reakciji stimulišu produkciju radikala. Joni Cu^+ i Fe^{2+} u slobodnoj ili heliranoj formi se u prisustvu vodonik-peroksida oksiduju do Cu^{2+} i Fe^{3+} pri čemu nastaje hidroksilni radikal (OH^{\bullet}) (Eghbaliferiz i Iranshahi, 2016; Castañeda-Arriaga i sar., 2018). Utvrđeno je da polifenolna jedinjenja sa dihidroksilnim grupama u *orto* položaju koja inače imaju sposobnost heliranja jona metala poseduju najizraženiju prooksidantnu aktivnost (Iwasaki i sar., 2011). Pored toga, polifenolna jedinjenja mogu indirektno stimulisati produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta povećanjem ekspresije NADPH oksidaza (NOX) (Maraldi, 2013). Sa druge strane, prooksidantna aktivnost može doprineti citotoksičnom delovanju polifenolnih jedinjenja indukujući apoptozu ćelija kancera, naročito u prisustvu jona bakra (Azmi i sar., 2005).

Tabela 20. Vrednosti OS ispitivanih ekstrakata, troloksa i DMSO*

Ekstrakt		Vrednost OS ^a	Statistički značajna razlika (p < 0.05) u odnosu na:
<i>G. macrorrhizum</i>	1n ^b	-5.99 (-10.52 – -4.40)	
	1p ^c	-13.02 (-18.67 – -6.16)	3n, 4n, 6n, 7n, 8n
<i>G. robertianum</i>	2n	-6.86 (-8.05 – -6.17)	
	2p	-9.32 (-10.57 – -6.71)	8n
<i>G. phaeum</i>	3n	-3.24 (-4.02 – -2.36)	1p, 3p
	3p	-10.93 (-18.43 – -5.84)	3n, 4n, 6n, 8n
<i>G. sanguineum</i>	4n	-3.54 (-4.82 – -1.50)	1p, 3p
	4p	-5.54 (-14.04 – -3.57)	
<i>G. palustre</i>	5n	-5.49 (-7.73 – -4.12)	
	5p	-6.25 (-12.74 – -5.68)	8n
<i>G. pyrenaicum</i>	6n	-2.51 (-5.69 – -0.50)	1p, 3p
	6p	-9.31 (-12.82 – -5.13)	8n
<i>G. lucidum</i>	7n	-4.53 (-6.76 – -1.74)	1p
	7p	-8.97 (-12.98 – -2.45)	
<i>G. columbinum</i>	8n	-1.47 (-2.98 – -0.69)	1p, 2p, 3p, 5p, 6p
	8p	-6.50 (-8.10 – -0.72)	
Troloks ^d		-7.01 (-7.53 – -6.51)	
DMSO		0,05 (-0,4 – 0,6)	

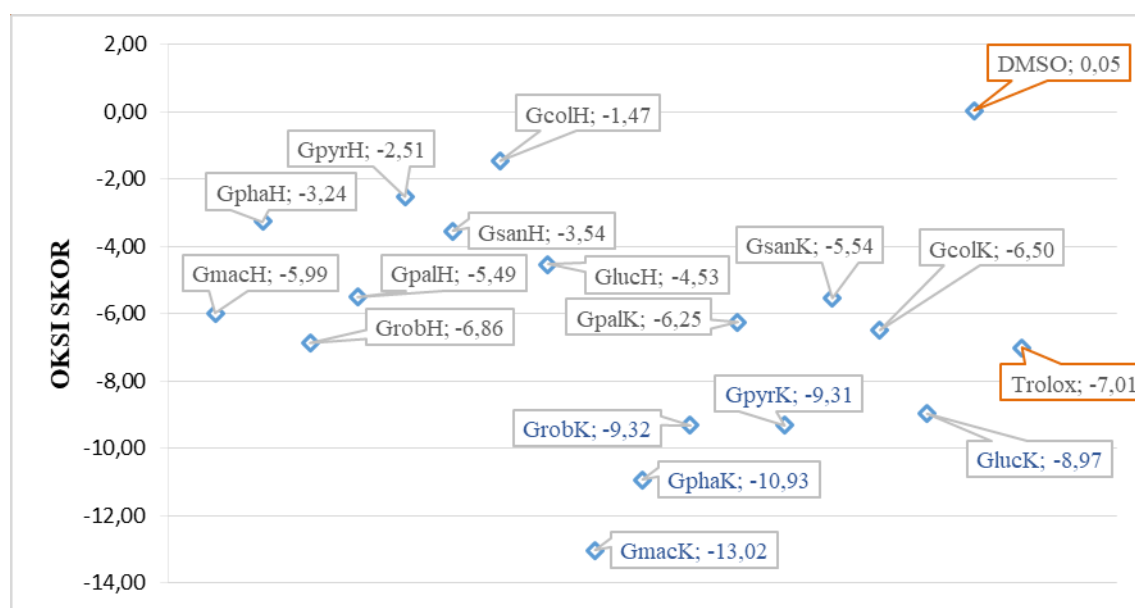
*DMSO korišćen kao rastvarač. ^a vrednosti Oksi skora izražene u vidu medijana i percentila. ^b Nadzemni delovi. ^c Podzemni delovi. ^d Brborić i sar. (2021).

Oksi skor svih ispitivanih uzoraka je bio u opsegu od -1,47 do -13,02 pri čemu se uticaj različite koncentracije ekstrakata nije pokazao statistički značajnim. Negativne vrednosti oksi skora ukazuju na visok antioksidantni potencijal i suprotno, više vrednosti oksi skora ukazuju na slabije antioksidantno, odnosno potencijalno izraženije prooksidantno delovanje.

Kod svih ispitivanih vrsta, ekstrakti podzemnih organa u odnosu na odgovarajuće ekstrakte nadzemnih organa dali su negativnije OS vrednosti što ukazuje na izraženiji antioksidantni potencijal. Ekstrakti podzemnih organa *G. macrorrhizum* (OS=-13,02), *G. phaeum* (OS=-10,93), *G. robertianum* (OS=-9,32), *G. pyrenaicum* (OS=-9,31) i *G. lucidum* (OS=-8,97) ispoljili su jači antioksidantni potencijal u poređenju sa troloksom, kao pozitivnom kontrolom (Slika 37).

Delovanje slično troloksu ispoljili su ekstrakti podzemnih delova *G. columbinum* (OS=-6,50), *G. palustre* (OS=-6,25) i *G. sanguineum* (OS=-5,54), kao i ekstrakti nadzemnih delova *G. robertianum* (OS=-6,86), *G. macrorrhizum* (OS=-5,99) i *G. palustre* (OS=-5,49). Nešto slabija aktivnost uočena je za ekstrakte nadzemnih delova *G. sanguineum* (OS=-3,54), *G. phaeum* (OS=-3,24), *G. pyrenaicum* (OS=-2,51) i *G. columbinum* (OS=-1,47).

Smanjenje vrednosti OS koje ukazuje na povećanje antioksidantnog kapaciteta humanog seruma i bolju antioksidantnu zaštitu u prisustvu ekstrakata posledica su pre svega povećanja vrednosti TAK seruma pod uticajem antioksidanasa prisutnih u ekstraktima.



Slika 37. Vrednosti OS ispitivanih ekstrakata i kontrole

Dobijeni rezultati nisu bili u korelaciji sa rezultatima ukupne antioksidantne i antiradikalske aktivnosti ekstrakata. Za ekstrakt podzemnog dela *G. palustre* koji je ispoljio najjaču redukcionu sposobnost i antiradikalisku aktivnost utvrđen je niži antioksidantni potencijal u humanom serumu u odnosu na gotovo sve ekstrakte podzemnih organa (osim u odnosu na *G. sanguineum*), kao i ekstrakt nadzemnog dela *G. robertianum*. Takođe, iako je bilo očekivano da ekstrakt nadzemnog dela *G. phaeum* najmanje uzrokuje smanjenje vrednosti OS usled najnižeg sadržaja polifenolnih sastojaka i najslabije redukcione i anti-DPPH aktivnosti, ipak najmanji uticaj na antioksidantnu zaštitu u humanom serumu ispoljili su ekstrakti nadzemnih delova *G. pyrenaicum* i *G. columbinum*. Na osnovu ovoga može se zaključiti da u ispoljavanju antioksidante zaštite u serumu ulogu imaju ne samo količina polifenolnih jedinjenja u

ekstraktima nego i drugi faktori koji verovatno uključuju i kvalitativni sastav ekstrakata, ali i međusobne uticaje biomolekula seruma i sastojaka ekstrakata. Značajan uticaj ispitivanih ekstrakata na parametre oksidativnog stresa u humanom serumu daje osnov za dalja ispitivanja koja će detaljnije objasniti ulogu ekstrakata i njihovih sastojaka u antioksidantnoj zaštiti.

Ispitivanjem redukcione sposobnosti i antiradikalnog delovanja utvrđeno je da ispitivani ekstrakti poseduju značajan *in vitro* antioksidantni potencijal, uporediv sa L-askorbinskom kiselinom kao poznatim antioksidansom. Takođe je utvrđeno da ispitivani ekstrakti dovode do značajnog povećanja antioksidantnog kapaciteta humanog seruma, što je po prvi put ispitano u ovom radu, pri čemu je efekat većine ekstrakata bolji ili uporediv sa efektom troloksa koji je korišćen kao pozitivna kontrola.

Dobijeni rezultati ukazuju na veoma snažan antioksidantni potencijal ispitivanih ekstrakata, a naročito su se u pogledu antioksidantne aktivnosti izdvojili ekstrakti podzemnih i nadzemnih delova *G. palustre*, *G. macrorrhizum* i *G. sanguineum* i ekstrakt podzemnog dela *G. phaeum* kod kojih je zabeležena najizraženija redukciona i antiradikalna aktivnost. Ekstrakti podzemnih delova *G. macrorrhizum*, *G. phaeum*, *G. robertianum*, *G. pyrenaicum* i *G. lucidum* ispoljili su najjači antioksidantni potencijal u humanom serumu. Visok antioksidantni potencijal ispitivanih ekstrakata posledica je visokog sadržaja polifenolnih jedinjenja uključujući geraniin i druge strukturno slične tanine. Antioksidantna aktivnost polifenolnih jedinjenja ogleda se u transferu H atoma ili elektrona, heliranju jona metala, kao i u regulaciji oksidoreduktaza (Leopoldini i sar., 2011; Liu i sar., 2019).

Dobijeni rezultati ispitivanja redukcione i antiradikalne aktivnosti ekstrakata u skladu su sa prethodnim ispitivanjima antioksidantnog delovanja odabranih vrsta (Radulović i sar., 2012; Sharopov i sar., (2017; Amaral i sar., 2009; Neagu i sar., 2010; Neagu i sar., 2017; Paun i sar., 2011; Grača i sar., 2016a; Catarino i sar., 2017; Ben Jemia i sar., 2013; Sokmen i sar., 2005; Pavlova i sar., 2019; Świątek i sar., 2021; Wafa i sar., 2017; Nikolova i sar., 2010; Khavrona i sar., 2018). Prethodno je utvrđena značajna anti-DPPH aktivnost geraniina ($IC_{50}=0,6 \mu M$), korilagina ($IC_{50}=0,4 \mu M$), galne ($IC_{50}=1,9 \mu M$) i elagne kiseline ($IC_{50}=1,7 \mu M$) (Ito, 2011), jedinjenja koja su prisutna u ekstraktima ispitivanih *Geranium* vrsta u ovom radu, i koja su svakako delom odgovorna za utvrđeni antioksidantni potencijal ispitivanih ekstrakata. Takođe je utvrđeno da geraniin može ublažiti oksidativni stres uticajem na biomarkere oksidativnog stresa, antioksidanse seruma i redoks balans glutaciona, kao i povećanjem aktivnosti superoksid-dismutaze (Chung i sar., 2018; Thitilertdecha i sar., 2020).

Izražen antioksidantni potencijal ispitivanih ekstrakata čini ove *Geranium* vrste potencijalnim izvorom egzogenih antioksidanasa koji mogu doprineti ublažavanju i/ili sprečavanju posledica oksidativnog stresa. Takođe, sve više pažnje posvećuje se ispitivanjima koja za cilj imaju otkrivanje novih, prirodnih aditiva, pri čemu biljke i biljni ekstrakti imaju poseban značaj. Postoje podaci koji ukazuju na potencijalno štetne efekte sintetskih aditiva. Mamur i sar. (2010) navode *in vitro* genotoksično delovanje antioksidansa natrijum-sorbata. Za parabene je dokazano da mogu povećati migraciju i invazivnost ćelija karcinoma dojke *in vitro* (Khanna i sar., 2014), dok nitrati i nitriti poseduju kancerogeni potencijal (Said Abasse i sar., 2022). U skladu sa tim, ispitivani ekstrakti mogu se posmatrati i kao potencijalni antioksidansi u prehrambenim i drugim proizvodima.

3.2. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost ispitivanih ekstrakata testirana je bujon mikrodilucionom metodom na sedam standardnih sojeva bakterija, uključujući Gram pozitivne bakterije *S. aureus*, *E. faecalis* i *B. subtilis*, Gram negativne bakterije *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i *S. abony*, jednom standardnom soju gljivice *C. albicans*, kao i na deset kliničkih izolata *E. coli* i sedam kliničkih izolata *K. pneumoniae*.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata, izraženi kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) tj. najniže koncentracije koje inhibiraju vidljiv rast mikroorganizama, prikazani su u Tabeli 21.

Antimikrobna aktivnost ekstrakata upoređena je sa aktivnošću standardnih antibiotika ampicilina, amikacina i vankomicina i antimikotika nistatina (Tabela 22).

Treba napomenuti da prema Rios i Recio (2005), značajnu antimikrobnu aktivnost poseduju ekstrakti sa minimalnim inhibitornim koncentracijama manjim od 100 µg/mL.

U okviru ove doktorske disertacije, po prvi put je ispitana antimikrobna aktivnost ekstrakata *G. phaeum* i *G. columbinum*.

Dobijeni rezultati pokazuju da je većina ispitivanih ekstrakata ispoljila antimikrobnu aktivnost i inhibirala rast svih standardnih sojeva mikroorganizama sa MIK vrednostima u opsegu 12,5-200 µg/mL. Minimalne inhibitorne koncentracije nisu utvrđene (MIK>200 µg/mL) jedino kod ispitivanja aktivnosti ekstrakata podzemnih delova *G. sanguineum* prema *S. aureus*, *G. columbinum* prema *B. subtilis* i *C. albicans* i *G. palustre* prema *C. albicans*.

Gram pozitivna bakterija *E. faecalis* pokazala se najosetljivijom prema ispitivanim ekstraktima (MIK=12,5-50 µg/mL). Najjaču aktivnost ispoljili su svi ekstrakti *G. phaeum* i *G. columbinum* i ekstrakt podzemnog dela *G. pyrenaicum* sa MIK vrednošću od 12,5 µg/mL. Pokazana aktivnost može se smatrati izrazito značajnom uzimajući u obzir da je utvrđena MIK vrednost β-laktamskog antibiotika ampicilina bila 3,6 µg/mL. Veoma značajnu antimikrobnu aktivnost prema *E. faecalis* sa MIK vrednošću od 25 µg/mL ispoljili su ostali ispitivani uzorci, osim ekstrakata nadzemnog dela *G. pyrenaicum* i podzemnog dela *G. lucidum* za koje je zabeležena takođe veoma dobra aktivnost, ali sa nešto višim vrednostima MIK od 50 µg/mL.

Značajnu antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus* sa MIK vrednošću 50 µg/mL pokazali su svi ekstrakti *G. palustre* i *G. pyrenaicum* i ekstrakti podzemnih delova *G. robertianum*, *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. lucidum* i *G. pyrenaicum*. Svi ostali ekstrakti, izuzev ekstrakta podzemnog dela *G. sanguineum* za koji MIK vrednost nije utvrđena, takođe su pokazali dobru aktivnost (MIK=100 µg/mL) prema ovoj bakteriji. MIK vrednosti amikacina, ampicilina i vankomicina prema ispitivanoj bakteriji bile su 2,0 µg/mL, 1,0 µg/mL i 2,2 µg/mL, redom.

Veoma značajan rezultat predstavlja zabeležena visoka osetljivost standardnog soja Gram negativne bakterije *E. coli* prema ekstraktima (MIK=25-100 µg/mL), imajući u vidu rezistentnost ove bakterije prema antibioticima. Najjače delovanje ispoljili su ekstrakti nadzemnog dela *G. robertianum* i podzemnog dela *G. palustre* sa MIK vrednošću od 25 µg/mL. Izražena aktivnost prema standardnom soju *E. coli* (MIK=50 µg/mL) zabeležena je i za ekstrakte nadzemnih delova *G. macrorrhizum*, *G. sanguineum*, *G. palustre*, *G. lucidum* i *G. columbinum* i podzemnih delova *G. macrorrhizum*, *G. robertianum*, *G. phaeum* i *G. sanguineum*. Za oba ekstrakta *G. pyrenaicum*, kao i za ekstrakte nadzemnog dela *G. phaeum* i podzemnih delova *G. lucidum* i *G. columbinum* utvrđene su MIK vrednosti od 100 µg/mL.

Treba pomenuti da su ekstrakti ispoljili inhibitornu aktivnost i prema drugim Gram negativnim bakterijama pored *E. coli*. Utvrđene MIK vrednosti od 50 µg/mL za ekstrakte nadzemnog dela *G. phaeum* i podzemnog dela *G. columbinum* prema standardnom soju *K. pneumoniae*, ukazuju na njihovu značajnu antimikrobnu aktivnost. Dobru aktivnost

(MIK=100 µg/mL) prema ovom soju ispoljili su i ostali ekstrakti, osim ekstrakta podzemnog dela *G. macrorrhizum* za koji je utvrđena MIK vrednost od 200 µg/mL. Amikacin i ampicilin delovali su inhibitorno prema ovom soju u koncentraciji od 8,6 µg/mL i 4,4 µg/mL, redom.

Gram negativna bakterija *S. abony* pokazala se najosetljivijom prema ekstraktima nadzemnog dela *G. columbinum* i podzemnog dela *G. lucidum* (MIK=50 µg/mL). Antimikrobnu aktivnost prema ovoj bakteriji, sa MIK vrednostima od 100 µg/mL, ispoljili su i svi ekstrakti *G. macrorrhizum*, *G. phaeum* i *G. sanguineum*, kao i ekstrakti nadzemnih delova *G. palustre* i *G. lucidum* i ekstrakti podzemnih delova *G. robertianum*, *G. pyrenaicum* i *G. columbinum*. Utvrđene MIK vrednosti amikacina i ampicilina bile su 3,2 µg/mL i 2,8 µg/mL, redom.

Takođe, antimikrobna aktivnost prema *P. aeruginosa* utvrđena je za sve ispitivane ekstrakte (MIK=100 µg/mL). Amikacin je u koncentraciji od 6,4 µg/mL zaustavio rast ove Gram negativne bakterije.

Antimikrobna aktivnost prema Gram pozitivnoj bakteriji *B. subtilis*, sa MIK vrednostima od 100 µg/mL, pokazana je za oba ekstrakta *G. macrorrhizum*, ekstrakte nadzemnih delova *G. palustre* i *G. lucidum* i ekstrakt podzemnog dela *G. robertianum*. Ampicilin je inhibitorao rast ove bakterije u koncentraciji od 4,2 µg/mL.

Aktivnost prema gljivici *C. albicans* ispoljili su svi ispitivani ekstrakti osim ekstrakata podzemnih delova *G. columbinum* i *G. palustre* za koje nisu utvrđene MIK vrednosti. Najjača aktivnost utvrđena je za ekstrakt podzemnog dela *G. macrorrhizum* (MIK=50 µg/mL), a značajnu aktivnost (MIK=100 µg/mL) ispoljili su i svi ekstrakti *G. robertianum*, *G. sanguineum* i *G. lucidum*, ekstrakti nadzemnih delova *G. macrorrhizum*, *G. palustre*, *G. pyrenaicum* i *G. columbinum* i ekstrakt podzemnog dela *G. phaeum*. Aktivnost ekstrakata bila je slabija u poređenju sa nistatinom (MIK=3,8 µg/mL), polienskim makrolidom koji se koristi u terapiji gljivičnih infekcija.

Antimikrobna aktivnost ekstrakata ispitana je i protiv kliničkih izolata Gram negativnih bakterija *E. coli* i *K. pneumoniae*.

Generalno, značajna inhibicija rasta svih izolata *E. coli* uočena je za ekstrakte nadzemnih delova *G. robertianum* i *G. columbinum* (MIK=25-100 µg/mL). Ostali ekstrakti, osim ekstrakata *G. palustre* i *G. lucidum*, su u istim inhibitornim koncentracijama delovali na većinu ispitivanih izolata ove bakterije. Jaku aktivnost (MIK=25 µg/mL) prema soju *E. coli* izolovanom iz brisa lohija pokazali su ekstrakti podzemnih delova *G. robertianum* i *G. phaeum*. Istu aktivnost ispoljili su ekstrakti podzemnih delova *G. robertianum* i *G. columbinum* prema jednom soju *E. coli* izolovanom iz brisa rane, dok su ekstrakti nadzemnih delova ovih vrsta u istoj koncentraciji inhibirali drugi soj izolovan takođe iz rane.

Naglašena aktivnost ekstrakata prema standardnom soju, ali i kliničkim izolatima *E. coli* je od posebnog značaja uzimajući u obzir da je ova Gram negativna bakterija jedan od najčešćih uzročnika bakterijskih infekcija.

Antimikrobna aktivnost ekstrakata prema kliničkim izolatima *K. pneumoniae* bila je slabija (MIK \geq 200 µg/mL). Za sve ispitivane ekstrakte, osim za ekstrakte podzemnih delova *G. macrorrhizum* i *G. robertianum*, utvrđena je minimalna inhibitorna koncentracija od 200 µg/mL prema soju *K. pneumoniae* izolovanom iz urina. Iste MIK vrednosti prema soju izolovanom iz krvi utvrđene su za oba ekstrakta *G. phaeum* i ekstrakte nadzemnih delova *G. macrorrhizum* i *G. sanguineum*.

Poznato je da Gram negativne bakterije generalno pokazuju veći stepen rezistencije prema antibioticima u poređenju sa Gram pozitivnim. Za razliku od Gram pozitivnih, kod Gram negativnih bakterija prisutna je spoljašnja membrana koja sadrži fosfolipide, lipopolisaharide i membranske proteine i predstavlja uzrok veće rezistencije Gram negativnih sojeva prema antibioticima jer lekovi na putu do ciljnog mesta delovanja moraju prvo proći ovu membranu

(Breijyeh i sar., 2020). Ipak, u ovom radu, Gram negativni sojevi nisu pokazali veću otpornost prema ispitivanim ekstraktima u odnosu na Gram pozitivne.

Najjača aktivnost ekstrakata utvrđena je prema *E. faecalis* kao Gram pozitivnoj i standardnom soju *E. coli* kao Gram negativnoj bakteriji, a posebno treba istaći uočenu značajnu antimikrobnu aktivnost većine ekstrakata prema određenim kliničkim izolatima *E. coli*. Sa druge strane, *B. subtilis* se pokazao najmanje osetljivim na ispitivane ekstrakte.

U literaturi postoje podaci o prethodnim ispitivanjima antimikrobne aktivnosti ekstrakata pojedinih vrsta roda *Geranium* prema različitim Gram pozitivnim, Gram negativnim bakterijama i gljivicama.

U poređenju sa rezultatima dobijenim u ovom radu, Radulović i sar. (2012) navode slabiju antimikrobnu aktivnost ekstrakata lista i rizoma *G. macrorrhizum* poreklom sa Svrljiških planina prema standardnim sojevima *B. subtilis* (MIK=250 µg/mL i MIK=150,6 µg/mL, redom), *K. pneumoniae* (MIK=500 µg/mL i MIK=620,5 µg/mL, redom), *E. coli* (MIK>500 µg/mL i MIK=5000 µg/mL, redom) i *C. albicans* (MIK>500 µg/mL i MIK=310,2 µg/mL, redom). Sa druge strane, aktivnost ekstrakta lista prema *S. aureus* je bila bolja (MIK=15,6 µg/mL) u poređenju sa rezultatima ovog ispitivanja gde je utvrđena vrednost MIK ekstrakta nadzemnog dela *G. macrorrhizum* iznosila 100 µg/mL.

Značajna antimikrobna aktivnost pokazana je za etanolne ekstrakte nadzemnog i podzemnog dela *G. pyrenaicum*, poreklom iz Turske, prema različitim standardnim sojevima bakterija, kliničkim izolatima i gljivici *C. albicans* (MIK=8-128 µg/mL) pri čemu su se, kao i u ovom ispitivanju, *S. aureus* i *E. faecalis* pokazale najosetljivijim (Özçelik i sar., 2010).

Wafa i sar. (2017) su u disk difuzionom testu ispitali antibakterijsku aktivnost metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *G. lucidum* poreklom iz Alžira prema *S. aureus* (zona inhibicije 16,37±0,22 mm), *B. subtilis* (zona inhibicije 13,51±0,10 mm), *P. aeruginosa* (zona inhibicije 6,84±0,14 mm) i *E. coli* (zona inhibicije 6,76±0,19 mm). Uzimajući u obzir dijаметre zona inhibicije, ekstrakt se pokazao neaktivnim prema *E. coli* i *P. aeruginosa* (zona inhibicije <9 mm) što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu gde je uočena značajna aktivnost ekstrakta prema navedenim sojevima (MIK=50 µg/mL i MIK=100 µg/mL, redom). Ipak, treba naglasiti da su ispitivanja vršena primenom različitih metoda. Vodeni ekstrakt nadzemnog dela *G. palustre*, poreklom iz Ukrajine, pokazao se aktivnim u disk difuzionom testu prema *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* (zona inhibicije 12-18 mm) (Khavrona i sar., 2018). Aktivnost prema navedenim sojevima potvrđena je i u ispitivanjima u okviru ove doktorske disertacije (MIK=50-100 µg/mL).

Etanolni ekstrakt cveta *G. sanguineum*, poreklom iz Tunisa, ispoljio je značajno slabiju antibakterijsku aktivnost prema Gram pozitivnim i Gram negativnim sojevima (MIK=1-6 mg/mL) u poređenju sa ekstraktom nadzemnog dela *G. sanguineum* ispitivanim u ovom radu (Hammami i sar., 2011).

Utvrđena antimikrobna aktivnost ekstrakata *Geranium* vrsta ispitivanih u okviru ove doktorske disertacije može se pripisati visokom sadržaju polifenolnih jedinjenja. Mehanizam antimikrobnog delovanja fenolnih jedinjenja može se objasniti prisustvom fenolne hidroksilne grupe u strukturi polifenolnih jedinjenja za koju se smatra da može indukovati smrt ćelije različitim mehanizmima uključujući oštećenje integriteta membranskih struktura i curenje ćelijskog sadržaja, delokalizaciju elektrona i depolarizaciju bakterijske ćelije i smanjenje gradijenta pH duž membrane i nivoa ATP-a (Bouarab i sar., 2019).

Antimikrobna aktivnost polifenolnih jedinjenja zavisi ne samo od količine, već i od strukture polifenolnih jedinjenja (Vaquero i sar., 2010). Hidrolizujući tanini antimikrobnu aktivnost ispoljavaju oštećenjem strukture i funkcije ćelijskog zida i membrane, interakcijom sa citoplazmom, enzimima (na primer, oksidoreduktazama) i prolinom bogatim proteinima ili

lipoteihoinskom kiselinom na površini ćelije, kao i inhibicijom glukoziltransferaze (Ekambaram i sar., 2016).

Ispitivani sojevi mikroorganizama predstavljaju značajne uzročnike različitih infektivnih bolesti. *Escherichia coli* dovodi do enteritisa, infekcija urinarnog trakta, septikemije i drugih infekcija uključujući neonatalni meningitis (Allocati i sar., 2013). *Klebsiella pneumoniae* je uslovno patogena bakterija koja izaziva oportunističke infekcije koje najviše pogađaju osobe sa oslabljenim imunskim sistemom. Izaziva širok spektar infekcija uključujući upalu pluća, infekcije urinarnog trakta, bakterijemije i apsces jetre (Li i sar., 2014; Paczosa i Mecsas, 2016). Sojevi *Klebsiella pneumoniae* izolovani iz bolničke sredine su često multirezistentni, tako da lečenje infekcija koje oni izazivaju danas predstavlja značajan kliničko terapijski problem. *Staphylococcus aureus* je uzročnik velikog broja infekcija uključujući bakterijemiju, endokarditis, infekcije kože i mekih tkiva, osteomijelitis, septički artritis, infekcije pacijenata sa implantatima, gastroenteritis, meningitis, sindrom toksičnog šoka, urinarne i respiratorne infekcije (Tong i sar., 2015). *Enterococcus faecalis* je sastavni deo normalne mikrobiote gastrointestinalnog trakta, ali može izazvati urinarne infekcije, infekcije hirurških rana, bakterijemiju i endokarditis (Hunt, 1998; Moellering, 1992; Woodford, 1998). Takođe je utvrđeno da ova bakterija može biti uzrok neuspeha endodontskog lečenja zuba (Alghamdi i Shakir, 2020). *Pseudomonas aeruginosa* je jedan od glavnih izazivača bolničkih infekcija praćenih pneumonijom i sepsom dok je *Salmonella abony*, kao i druge bakterije ovog roda, uzročnik salmoneloze (Parker i sar., 2016). Treba pomenuti da su *S. aureus*, *Salmonella* spp. i *E. coli*, pored *Campylobacter* spp. i *Listeria monocytogenes*, najčešći kontaminanti hrane životinjskog porekla (Abebe i sar., 2020). *Candida albicans* je čest uzročnik infekcija oralne šupljine, genitalnog trakta i kože (Parker i sar., 2016). Tokom 2019. godine, 13,7 miliona smrtnih slučajeva povezano je sa infekcijama uzrokovanih bakterijama čineći 13,6% ukupnog broja smrtnih slučajeva. Bakterija *S. aureus* povezana je sa čak preko milion smrtnih slučajeva i zajedno sa *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* čini grupu od 5 najčešćih uzročnika smrtnog ishoda uzrokovanog bakterijskom infekcijom. U većini slučajeva, smrt je posledica infekcija donjih partija respiratornog trakta (pneumonije) i septikemije (Ikuta i sar., 2022). Veliki problem i pretnju javnom zdravlju predstavlja rastuća rezistencija na postojeće antimikrobne lekove. Prema procenama, do 2050. godine, broj smrtnih slučajeva usled rezistencije na antibiotike biće 10 miliona godišnje (O'Neill, 2014). Razvoj bakterijske rezistencije prema antibioticima je posledica sposobnosti ovih mikroorganizama da razmenjuju genetski materijal, uglavnom horizontalnim transferom gena (Poirel i sar., 2018). Mehanizmi rezistencije uključuju enzimsku inaktivaciju antibiotika, smanjenje permeabilnosti membrane, aktivaciju efluksa i promenu ciljnog mesta delovanja antibiotika (Pulingam i sar., 2022). Dalje, sve više pažnje posvećuje se istraživanjima koja za cilj imaju otkrivanje prirodnih aditiva s obzirom na to da postoje podaci o štetnom delovanju sintetskih antioksidanasa i konzervanasa (Bauer i sar., 2001; Carocho i sar., 2013; Khanna i sar., 2014). U skladu sa tim, postoji potreba za otkrivanjem novih antimikrobnih i antioksidantnih agenasa što je u osnovi ovog istraživanja.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata podzemnih i nadzemnih organa odabranih vrsta roda *Geranium* uključujući i vrste *G. phaeum* i *G. columbinum* za koje ne postoje podaci o antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata. Niske MIK vrednosti prema standardnim sojevima, kao i prema određenim kliničkim izolatima ukazuju na njihov potencijalni terapijski značaj, ali i potencijalnu upotrebu kao sastojaka funkcionalne hrane ili prehrambenih aditiva, uzimajući u obzir i njihov naglašeni antioksidantni potencijal.

Tabela 21. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstraktata ispitivanih vrsta

Mikroorganizam	Minimalna Inhibitorna Koncentracija MIK ($\mu\text{g/mL}$)															
	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. lucidum</i>		<i>G. columbinum</i>	
	n ^a	p ^b	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
ATCC standardni sojevi																
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	100	100	100	50	100	50	100	>200	50	50	50	50	100	50	100	50
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	25	25	25	25	12,5	12,5	25	12,5	25	25	50	12,5	25	50	12,5	12,5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	100	100	200	100	200	200	200	200	100	200	200	200	100	200	200	>200
<i>E. coli</i> ATCC 10536	50	50	25	50	100	50	50	50	50	25	100	100	50	100	50	100
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	100	200	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>S. abony</i> NCTC 6017	100	100	200	100	100	100	100	100	100	200	200	100	100	50	50	100
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	100	50	100	100	200	100	100	100	100	>200	100	200	100	100	100	>200
Klinički izolati <i>E. coli</i>																
aspirat nazofarinksa	100	50	50	100	100	50	50	50	100	200	100	50	200	>200	100	100
hemokultura	100	50	100	50	200	100	100	100	200	50	200	100	200	>200	100	100

Mikroorganizam	Minimalna Inhibitorna Koncentracija MIK (µg/mL)															
	<i>G. macrorrhizum</i>		<i>G. robertianum</i>		<i>G. phaeum</i>		<i>G. sanguineum</i>		<i>G. palustre</i>		<i>G. pyrenaicum</i>		<i>G. lucidum</i>		<i>G. columbinum</i>	
	n ^a	p ^b	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p
bris rane	100	50	100	100	100	100	50	100	200	>200	100	100	200	100	100	100
bris lohija	100	50	100	25	100	25	100	50	200	50	100	50	200	100	100	50
bris rane	100	50	50	25	50	50	50	50	50	100	50	50	50	50	50	25
bris rane	100	>200	25	>200	50	>200	100	>200	100	>200	50	>200	100	>200	25	>200
bris lohija	100	100	100	100	100	100	100	100	200	>200	100	100	100	200	100	100
bris ždrelela	50	50	50	50	100	100	50	100	50	>200	50	100	100	50	50	100
aspirat bronha	200	100	100	100	100	100	200	50	200	>200	100	100	200	200	100	50
bris ždrelela	100	100	100	50	100	100	100	100	100	>200	100	100	200	100	100	50
Klinički izolati <i>K. pneumoniae</i>																
hemokultura	200	>200	>200	>200	200	200	200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
hemokultura	>200															
urinokultura	200	>200	200	>200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
peritonealna tečnost	>200															
hemokultura	>200															
hemokultura	>200															
hemokultura	>200															

^a Nadzemni organi. ^b Podzemni organi.

Tabela 22. Minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika i nistatina

Mikroorganizam	Minimalna Inhibitorna Koncentracija MIK ($\mu\text{g/mL}$)			
	amikacin	ampicilin	vankomicin	nistatin
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2,0	1,0	2,2	n.t.
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	n.t. ^a	3,6	n.t.	n.t.
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	n.t.	4,2	n.t.	n.t.
<i>E. coli</i> ATCC 10536	2,4	n.t.	n.t.	n.t.
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	8,6	4,4	n.t.	n.t.
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	6,4	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S. abony</i> NCTC 6017	3,2	2,8	n.t.	n.t.
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	n.t.	n.t.	n.t.	3,8

^a n.t. – nije testirano.

3.3. Citotoksična aktivnost

In vitro citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata, kao i geraniina i elagne kiseline, polifenolnih jedinjenja prisutnih u ispitivanim ekstraktima, ispitana je kolorimetrijskim MTT testom na ćelijskim linijama humanog karcinoma prostate (PC-3), kolona (HT-29), grlića materice (HeLa) i melanoma (Hs 294T). Kao pozitivna kontrola korišćen je doksorubicin, citostatik iz grupe citotoksičnih antibiotika koji ima primenu u terapiji velikog broja tumora. Selektivnost delovanja ekstrakata i jedinjenja utvrđena je ispitivanjem na zdravim ćelijama – humanim fibroblastima pluća (MRC-5).

Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrednost koja predstavlja koncentraciju ekstrakta ili jedinjenja koja smanjuje vijabilnost ćelija za 50% (Tabela 23).

Prema američkom Institutu za kancer (eng. *National Cancer Institute*), citotoksičnim se smatraju ekstrakti sa vrednošću IC_{50} manjom od 30 $\mu\text{g/mL}$ (Suffness i Pezzuto, 1991).

Uzimajući u obzir ovaj kriterijum, među ispitivanim ekstraktima vrsta roda *Geranium* uočena je veoma značajna citotoksičnost većine ekstrakata prema ćelijama karcinoma grlića materice (HeLa) ($IC_{50}=2,52-28,98 \mu\text{g/mL}$), a najefektivniji su bili ekstrakti podzemnih delova *G. sanguineum* ($IC_{50}=2,52 \mu\text{g/mL}$), *G. pyrenaicum* ($IC_{50}=7,73 \mu\text{g/mL}$) i *G. columbinum* ($IC_{50}=7,98 \mu\text{g/mL}$). Interesantna aktivnost prema ovim ćelijama utvrđena je za ekstrakte nadzemnih delova *G. palustre* ($IC_{50}=45,97 \mu\text{g/mL}$) i *G. phaeum* ($IC_{50}=51,29 \mu\text{g/mL}$).

Sa druge strane, najveći broj ispitivanih ekstrakata nije ispoljio značajnu citotoksičnost prema ćelijama humanog karcinoma prostate (PC-3), kolona (HT-29) i melanoma (Hs 294T). Izuzetak je ekstrakt nadzemnog dela *G. lucidum* koji je delovao na HT-29 ćelijsku liniju sa $IC_{50}=22,54 \mu\text{g/mL}$. Slabija aktivnost utvrđena je za ekstrakt nadzemnog dela *G. robertainum* prema ćelijama karcinoma prostate ($IC_{50}=76,30 \mu\text{g/mL}$) i ekstrakt nadzemnog dela *G. lucidum* prema ćelijama melanoma ($IC_{50}=94,66 \mu\text{g/mL}$).

Većina ispitivanih ekstrakata nije u značajnoj meri delovala na zdrave ćelije fibroblasta pluća ($IC_{50}>104,19 \mu\text{g/mL}$). Slabiju selektivnost ispoljili su ekstrakti *G. lucidum* ($IC_{50}=43,75 \mu\text{g/mL}$ za ekstrakt podzemnog i $IC_{50}=66,65 \mu\text{g/mL}$ za ekstrakt nadzemnog dela) i ekstrakt nadzemnog dela *G. palustre* ($IC_{50}=92,04 \mu\text{g/mL}$).

Geraniin, elagni tanin koji je identifikovan u većini ispitivanih ekstrakata, takođe je ispoljio najbolje delovanje prema ćelijama karcinoma grlića materice ($IC_{50}=12,88 \mu\text{g/mL}$), a u određenoj meri delovao je i na ostale ćelijske linije ($IC_{50}=44,41-80,94 \mu\text{g/mL}$). Pokazao je naglašenu selektivnost s obzirom na to da nije uticao na preživljavanje zdravih ćelija - humanih fibroblasta pluća (MRC-5) ($IC_{50}>1000 \mu\text{g/mL}$).

Slabija aktivnost ($IC_{50}=65,62-221,51 \mu\text{g/mL}$), ali i niska selektivnost ($IC_{50}=44,75 \mu\text{g/mL}$) utvrđena je za elagnu kiselinu.

Doksorubicin, kao kontrolna supstanca, ispoljio je najizraženije delovanje prema svim ćelijskim linijama ($IC_{50}=0,71-20,51 \mu\text{g/mL}$), ali i najmanju selektivnost ($IC_{50}=0,11 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 23. Citotoksična aktivnost ekstrakata, jedinjenja i kontrolne supstance

Vrsta		IC ₅₀ (µg/mL)				
		maligne ćelije				zdrave ćelije
		PC-3	HT-29	HeLa	Hs 294T	MRC-5
<i>G. macrorrhizum</i>	n ^a	329,84	>1000	28,98	134,68	276,67
	p ^b	101,28	669,00	8,94	>1000	104,19
<i>G. robertianum</i>	n	76,30	284,35	11,49	156,59	293,86
	p	>1000	>1000	8,85	>1000	152,69
<i>G. phaeum</i>	n	>1000	>1000	51,29	266,12	>1000
	p	>1000	>1000	19,93	>1000	>1000
<i>G. sanguineum</i>	n	>1000	304,77	27,35	282,38	123,72
	p	>1000	>1000	2,52	>1000	130,61
<i>G. palustre</i>	n	>1000	598,36	45,97	180,56	92,04
	p	>1000	>1000	30,54	286,78	325,64
<i>G. pyrenaicum</i>	n	607,21	>1000	19,21	147,51	357,27
	p	>1000	451,81	7,73	>1000	>1000
<i>G. lucidum</i>	n	123,69	22,54	10,28	94,66	66,65
	p	>1000	>1000	15,7	>1000	43,75
<i>G. columbinum</i>	n	>1000	>1000	11,42	114,13	>1000
	p	>1000	>1000	7,98	>1000	288,05
geraniin		44,41	45,58	12,88	80,94	>1000
elagna kiselina		65,62	114,28	77,37	221,51	44,75
doksorubicin		20,51	0,71	0,79	15,60	0,11

^a Nadzemni delovi. ^b Podzemni delovi.

Rezultati ovih ispitivanja su u skladu sa prethodnim zapažanjima o *in vitro* citotoksičnom delovanju ekstrakata vrsta roda *Geranium*. U prethodnim ispitivanjima, MTT testom pokazano je da vodeni ekstrakti listova *G. robertianum* prečišćeni procesom ultrafiltracije ispoljavaju citotoksično delovanje prema ćelijama karcinoma larinksa (Hep-2) (Neagu i sar., 2017). Dalje, Graca i sar. (2016a) su u sulforodamin B testu utvrdili citotoksično delovanje različitih vodenih i nepolarnih ekstrakata cele biljke *G. robertianum* prema ćelijama karcinoma dojke (MCF-7) ($IC_{50}=60-179 \mu\text{g/mL}$), pluća (NCI-H460) ($IC_{50}=66-190 \mu\text{g/mL}$), grlića materice (HeLa) ($IC_{50}=57-380 \mu\text{g/mL}$) i hepatocelularnog karcinoma (HepG2) ($IC_{50}=45,68-177 \mu\text{g/mL}$). Infuz i dekokt pokazali su veću aktivnost prema ćelijama hepatocelularnog ($IC_{50}=45,68 \mu\text{g/mL}$ i $IC_{50}=52,2 \mu\text{g/mL}$, redom) i karcinoma dojke ($IC_{50}=74 \mu\text{g/mL}$ i $IC_{50}=64 \mu\text{g/mL}$, redom). Acetonski ekstrakt ispoljio je ujednačeno citotoksično delovanje prema svim ćelijama karcinoma ($IC_{50}=59-71 \mu\text{g/mL}$) pri čemu su ćelije karcinoma grlića materice bile najosetljivije, kao i u slučaju ispitivanih metanolnih ekstrakata *G. robertianum* u okviru ove doktorske disertacije ($IC_{50}=11,49 \mu\text{g/mL}$ za ekstrakt nadzemnog i $IC_{50}=8,85 \mu\text{g/mL}$ za ekstrakt podzemnog dela).

Sharapov i sar. (2017) su MTT testom utvrdili citotoksično delovanje ekstrakata lista i korena *G. macrorrhizum* prema ćelijama humane leukemije CCRF-CEM ($IC_{50}=22,4$ i $IC_{50}=112,3 \mu\text{g/mL}$, redom) i CEM/ADR 5000 ($IC_{50}=98,3$ i $IC_{50}=154,2 \mu\text{g/mL}$, redom). Doksorubicin kao standardni citostatik je u manjim koncentracijama inhibirao preživljavanje ćelija ($IC_{50}=2,3$ i $IC_{50}=5,2 \mu\text{g/mL}$, redom).

Świątek i sar., (2021) su istim testom ispitali citotoksičnost različitih ekstrakata nadzemnog dela *G. pyrenaicum* prema ćelijama karcinoma hipofarinksa FaDu ($IC_{50}=39,49-75,46 \mu\text{g/mL}$), karcinoma grlića materice (HeLa) ($IC_{50}=32,34-132,44 \mu\text{g/mL}$) i karcinoma kolona (RKO) ($IC_{50}=35,27-124,77 \mu\text{g/mL}$). Etilacetatni ekstrakt ispoljio je najjaču aktivnost prema HeLa ćelijskoj liniji. Sa druge strane, za metanolni ekstrakt uvrđena je znatno viša IC_{50} vrednost ($IC_{50}=132,44 \mu\text{g/mL}$) što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu gde je uočena značajna citotoksična aktivnost ekstrakta nadzemnih delova *G. pyrenaicum* prema ćelijama karcinoma grlića materice ($IC_{50}=19,21 \mu\text{g/mL}$).

U ovom radu geraniin je ispoljio citotoksičnu aktivnost prema ispitivanim ćelijskim linijama ($IC_{50}=12,88-80,94 \mu\text{g/mL}$), pri čemu su se HeLa ćelije pokazale najosetljivijim ($IC_{50}=12,88 \mu\text{g/mL}$). Takođe, utvrđena je visoka selektivnost ovog jedinjenja prema ćelijama karcinoma, s obzirom na to da nije delovao na zdrave ćelije fibroblasta pluća ($IC_{50}>1000 \mu\text{g/mL}$). Aktivnost geraniina prema korišćenim ćelijskim linijama karcinoma bila je slabija u poređenju sa pojedinim ekstraktima, što ukazuje da i drugi sastojci ekstrakata doprinose citotoksičnom delovanju. Utvrđeno delovanje geraniina je u skladu sa dosadašnjim zapažanjima. U prethodnim ispitivanjima pokazano je da geraniin indukuje apoptozu ćelija kolorektalnog adenokarcinoma (Colo205 i Colo320) (Guo i sar., 2018), karcinoma dojke (MCF-7) (Zhai i sar., 2016), jajnika (OVCAR3 i SKOV3) (Wang i sar., 2017) i pluća (A549) (Li i sar., 2013), a takođe smanjuje migraciju ćelija karcinoma pluća, invazivnu sposobnost i njihovu otpornost (Ko, 2015). Citotoksične i antiproliferativne efekte geraniin ostvaruje različitim mehanizmima uključujući indukciju hromozomske nestabilnosti, inhibiciju NF- κ B, zaustavljanje ćelijske deobe, generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta, narušavanje membranskog potencijala mitohondrija i inhibiciju epitelno-mezenhimske tranzicije indukovane faktorom rasta TGF- β 1 (Gui i sar., 2018; Wang i sar., 2017; Zhai i sar., 2016; Ko, 2015). Takođe, uočena visoka selektivnost geraniina je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Zhai i sar., 2016; Wang i sar., 2017).

Pokazana aktivnost elagne kiseline ($IC_{50}=65,62-221,51 \mu\text{g/mL}$) slabija je u poređenju sa geraniinom. Prethodna istraživanja ukazuju na citotoksični potencijal ove kiseline. Utvrđeno je selektivno citotoksično i antiproliferativno delovanje elagne kiseline prema ćelijama tumora kolona (Caco-2, SW480, HCT-15 i HCT-116) (Losso i sar., 2004; Narayanan i Re, 2001; Larrosa i sar., 2006; Umesalma i sar., 2015; Zho i sar., 2017), dojke (MCF-7 i Hs 578T) (Losso i sar.,

2004; Larrosa i sar., 2006), grlića materice (HeLa, SiHa i C33A) (Li i sar., 2018), prostate (DU 145 i PC-3) (Losso i sar., 2004; Lansky i sar., 2005; Malik i sar., 2011), bešike (T24 i TSGH8301) (Li i sar., 2005; Lin i sar., 2001) i melanoma (1205Lu, WM852c i A375) (Jensen i sar., 2011). Slično kao kod geraniina, navedeni efekti su posledica zaustavljanja ćelijske deobe, stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta, smanjenja nivoa metaloproteinaze-2 i -9, inhibicije migracije tumorskih ćelija i inhibicije angiogeneze (Losso i sar., 2004; Umesalma i sar., 2015; Narayanan i Re, 2001).

Citotoksičnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata *Geranium* vrsta doprinose i druga jedinjenja čija citotoksičnost nije ispitana u ovom istraživanju. Ranije je utvrđeno da korilagin, elagni tanin koji je zastupljen u značajnim količinama u ekstraktima nadzemnih delova svih ispitivanih vrsta osim *G. phaeum*, kao i u ekstraktima podzemnih delova *G. robertianum* i *G. lucidum*, deluje izrazito citotoksično na ćelije tumora jajnika (A2780) ($IC_{50}=1,20 \mu\text{g/mL}$), pluća (A549) ($8,25 \mu\text{g/mL}$) (Chen i Ren, 1999), nazofarinksa (KB) ($IC_{50}=0,25 \mu\text{g/mL}$), osteosarkoma (OS-732) ($IC_{50}=7,42 \mu\text{g/mL}$), kolona (HCT-8) ($IC_{50}=9,08 \mu\text{g/mL}$), želuca (MK-1) ($IC_{50}=8,00 \mu\text{g/mL}$) (Liu i sar., 2002) i jetre (SMMC7721) ($IC_{50}=23,4 \mu\text{M}$) (Ming i sar., 2013).

Takođe, pokazano je da telimagrandin I, elagni tanin identifikovan u ekstraktima *G. macrorrhizum* i *G. pyrenaicum*, ispoljava aktivnost prema ćelijama tumora dojke (MCF-7) ($IC_{50}=76,66 \mu\text{g/mL}$) (Al-Sayed i sar., 2012), grlića materice (HeLa) (Yi i sar., 2006), jetre (HepG-2) ($IC_{50}=66,00 \mu\text{g/mL}$) (Al-Sayed i sar., 2012) i prostate (LNCaP) ($IC_{50}=66,35 \mu\text{g/mL}$) (Kim i sar., 2013).

Za telimagrandin II, elagni tanin koji je bio zastupljen u ekstraktima nadzemnog dela *G. phaeum* i podzemnog dela *G. lucidum*, postoje podaci o aktivnosti prema ćelijama tumora grlića materice (HeLa) (Le i sar., 2014), prostate (LNCaP) ($IC_{50}=43,08 \mu\text{g/mL}$) (Kim i sar., 2013) i dojke (MCF-7) (Le i sar., 2014).

Za galnu kiselinu, koja je bila prisutna u svim ispitivanim ekstraktima, osim u ekstraktu podzemnog dela *G. palustre*, u prethodnim studijama zabeleženo je citotoksično delovanje prema ćelijama tumora grlića materice (HeLa) ($IC_{50}=80 \mu\text{M}$) (Park, 2017), pluća (SBC-3, EBC-1 i A549) (Ohno i sar., 1999), prostate (DU 145) ($IC_{50}=15,60 \mu\text{g/mL}$) (Chen i sar., 2009), jetre (SMMC-7721) ($IC_{50}=22,10 \mu\text{g/mL}$) (Sun i sar., 2016), melanoma (A375.S2) (Lo i sar., 2010) i kolona (HCT-15) ($IC_{50}=740 \mu\text{M}$) (Subramanian i sar., 2016) i dojke (MCF-7) ($IC_{50}=18,50 \mu\text{g/mL}$) (Rezaei-Seresht i sar., 2019).

Dobijeni rezultati ukazuju da ispitivane biljne vrste poseduju citotoksični potencijal pre svega prema ćelijama karcinoma grlića materice (HeLa), kao i prema ćelijama karcinoma kolona (HT-29) u slučaju nadzemnog dela *G. lucidum*. Takođe, utvrđeno je da geraniin, elagni tanin identifikovan u većini ispitivanih vrsta, doprinosi citotoksičnom delovanju ekstrakata. Ispitivani ekstrakti i geraniin selektivno su delovali na ćelije karcinoma, u znatno manjoj meri uzrokujući smrt zdravih ćelija, što ukazuje na njihov povoljan bezbednosni profil i čini ih dobrim kandidatima za dalja ispitivanja.

ZAKLJUČCI

1. U okviru ove doktorske disertacije ispitivano je osam vrsta roda *Geranium*: *G. macrorrhizum*, *G. robertianum*, *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. sanguineum*, *G. pyrenaicum*, *G. columbinum* i *G. lucidum*, sakupljenih u periodu cvetanja na prirodnim staništima na Vlasinskoj visoravni (jugoistočna Srbija). Ispitivanje je obuhvatilo hemijsku analizu isparljivih frakcija i metanolnih ekstrakata podzemnih i nadzemnih organa, kao i farmakološku karakterizaciju ekstrakata u pogledu antioksidantne, antimikrobne i citotoksične aktivnosti.
2. Imajući u vidu da pojedine vrste, koje su predmet proučavanja ove doktorske disertacije, do sada nisu ispitivane ili su samo delimično proučene, uporedna hemijska analiza isparljivih frakcija i metanolnih ekstrakata nadzemnih i podzemnih organa omogućila je upoznavanje njihovog hemijskog sastava i unapređenje znanja o sekundarnim metabolitima biljaka ovog roda.
3. Isparljive frakcije nadzemnih i podzemnih delova izolovane su destilacijom vodenom parom i analizirane gasnom hromatografijom sa plameno-jonizacionim i masenim detektorom (GC-FID/MS). Hemijski sastav isparljivih frakcija *G. palustre* i isparljive frakcije podzemnog dela *G. pyrenaicum* ispitan je po prvi put u okviru ovog rada. Takođe, za vrste *G. sanguineum* i *G. columbinum* po prvi put ispitan je sastav isparljivih frakcija dobijenih posebno iz nadzemnih i podzemnih delova.
4. Seskviterpeni su bili dominantna grupa jedinjenja (29,0-94,6%) u isparljivim frakcijama podzemnog dela *G. macrorrhizum* i nadzemnih delova svih ispitivanih vrsta, osim *G. phaeum* i *G. columbinum*, gde su najzastupljeniji bili diterpeni (41,1-43,0%). Najveći deo isparljivih frakcija podzemnih delova ostalih vrsta činile su masne kiseline i njihovi derivati (70,3-95,7%).
5. Glavni sastojak isparljive frakcije nadzemnog dela *G. macrorrhizum* bio je germakron (73,3%), dok je δ -gvajen preovladao u isparljivoj frakciji podzemnog dela ove vrste (76,8%). Heksadekanska kiselina (6,6-21,1%) i fitol (9,9-41,5%) bili su dominantna ili među najzastupljenijim jedinjenjima u isparljivim frakcijama nadzemnih delova svih vrsta, osim *G. macrorrhizum*. Pored njih, u isparljivim frakcijama nadzemnih delova izdvojili su se: heksahidrofarnetilacetone (15,7%) u *G. phaeum*, germakren D (15,4%), (*E*)-kariofilen (10,6%) i kariofilen-oksidi (10,2%) u *G. pyrenaicum*, (*E*)-kariofilen (9,5%) i pentadekanal (7,6%) u *G. lucidum*, dok prisustvo β -selinena (18,6%) kao dominantnog sastojka u isparljivoj frakciji nadzemnog dela razlikuje *G. palustre* od ostalih vrsta.
6. U isparljivim frakcijama podzemnih organa svih vrsta, osim *G. macrorrhizum*, glavno jedinjenje bila je heksadekanska kiselina (35,1-79,2%).
7. Multivarijantna statistička klaster analiza (UPGMA) sastava isparljivih frakcija pokazala je odvajanje *G. macrorrhizum* od ostalih vrsta. U okviru ostalih vrsta, posebno su se odvojile isparljive frakcije podzemnih od frakcija nadzemnih delova. Uočena sličnost između frakcija podzemnih delova potiče, pre svega, od prisustva heksadekanske kiseline kao dominantnog jedinjenja. Razlike između vrsta potiču, pre svega, od razlika u sastavu isparljivih frakcija nadzemnih delova.
8. Hemijska karakterizacija metanolnih ekstrakata izvršena je primenom spektrofotometrijskih i hromatografskih metoda. Spektrofotometrijska analiza je pokazala da su ispitivani ekstrakti bogati polifenolnim jedinjenjima (170,64-636,321 mg GAE/g

- suvog ekstrakta), kao i da su tanini dominantni polifenoli (161,14-414,02 mg GAE/g) u svim ekstraktima, izuzev u ekstraktu nadzemnog dela *G. phaeum*.
9. Primenom hromatografije u koloni, iz metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *G. palustre* izolovana su dva jedinjenja čija je struktura utvrđena interpretacijom njihovih UV-Vis, ESI-MS i NMR spektara, kao i poređenjem sa literaturnim podacima. Izolovan je jedan elagni tanin, identifikovan kao korilagin i jedan galoilovani flavonolni heterozid identifikovan kao astragalin-2''-O-galat.
 10. Kvalitativna i kvantitativna analiza hemijskog sastava metanolnih ekstrakata izvršena je primenom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom. Osim *G. robertianum* i *G. pyrenaicum*, ostale vrste do sada nisu detaljno ispitane u pogledu polifenolnih sastojaka, a posebno tanina.
 11. U ekstraktima je utvrđeno prisustvo i određen sadržaj ukupno sedam fenolkarboksilnih kiselina (elagne, galne, galoilhina, galoilšikiminske, protokatehinske, hlorogenske i brevifolin karboksilne kiseline), 12 flavonoidnih jedinjenja (kvercetina, kvercetin-galoilheksozida, dva pentozida kvercetina, kvercetin-deoksiheksozida, hiperozida, izokvercitrina, kemferola, astragalina, astragalin-2''-O-galata, kemferol-metiletra i kemferol-dimetiletra) i 14 jedinjenja taninske strukture (geraniina i njegovog izomera, korilagina, dva anomera telimagrandina I i tri jedinjenja izomerne strukture, telimagrandina II, hebulaginske kiseline, galoilglukoze, digaloilglukoze, trigaloilglukoze i pentagaloilglukoze).
 12. Ekstrakti nadzemnih organa bili su bogatiji fenolkarboksilnim kiselinama u odnosu na ekstrakte podzemnih organa, a najveći ukupan sadržaj određen je u ekstraktima nadzemnih delova *G. palustre* i *G. macrorrhizum* (35,24 mg/g i 35,01 mg/g, redom).
 13. Galna, elagna i galoilhina kiselina bile su prisutne u najvećem broju ekstrakata, pri čemu je najzastupljenija uglavnom bila elagna kiselina (3,91-21,25 mg/g). Izuzetak su bili ekstrakti nadzemnih delova *G. palustre* i *G. macrorrhizum* gde je bila dominantna hlorogenska kiselina (22,14 mg/g i 16,27 mg/g, redom).
 14. U ekstraktima nadzemnih delova svih vrsta, osim *G. pheum*, utvrđeno je prisustvo i određen sadržaj flavonoidnih jedinjenja, dok u ekstraktima podzemnih organa nisu bili prisutni flavonoidi.
 15. Generalno, sadržaj pojedinačnih flavonoidnih jedinjenja (1,06-8,71 mg/g) bio je niži u odnosu na sadržaj taninskih jedinjenja i fenolkarboksilnih kiselina. Izuzetak je bio ekstrakt *G. palustre* sa značajnom količinom astragalin-2''-O-galata (28,75 mg/g).
 16. U nadzemnom delu *G. macrorrhizum* utvrđeno je prisustvo najvećeg broja različitih flavonoidnih jedinjenja, dok su se po najvišem sadržaju flavonoida izdvojili *G. macrorrhizum*, *G. palustre* i *G. pyrenaicum*.
 17. Hidrolizujući tanini bili su dominantna grupa polifenolnih jedinjenja u većini analiziranih ekstrakata. Od elagnih tanina, identifikovani su i određen je sadržaj geraniina i njegovog izomera, korilagina, telimagrandina I i jedinjenja izomerne strukture, telimagrandina II i hebulaginske kiseline, a od galnih tanina galoilglukoze, digaloilglukoze, trigaloilglukoze i pentagaloilglukoze.
 18. U većini ekstrakata dominantno jedinjenje bio je geraniin (20,16-160,84 mg/g), a pored njega u nadzemnim delovima svih ispitivanih vrsta, osim *G. phaeum*, u značajnoj količini nalazio se i korilagin (17,20-76,76 mg/g, izraženo kao galna kiselina). Najviši sadržaj geraniina određen je u nadzemnom delu *G. sanguineum* (160,84 mg/g). Ekstrakt nadzemnog dela *G. palustre* razlikovao se po prisustvu i visokom sadržaju izomera

- geraniina (175,81 mg/g), a ekstrakti *G. phaeum* izdvojili su se od ostalih zbog manjeg broja i nižeg sadržaja taninskih jedinjenja.
19. U svim ekstraktima bili su prisutni različiti galni tanini u koncentracijama znatno nižim (0,20-9,63 mg/g) u odnosu na elagne tanine.
 20. Prisustvo pojedinih fenolnih jedinjenja po prvi put je utvrđeno u nekim vrstama: kvercetina u *G. lucidum*, kemferola, dva pentozida i deoksiheksozida kvercetina u *G. columbinum*, astragalina u *G. palustre*, astragalin-2''-*O*-galata i kvercetin-galoilheksozida u *G. palustre*, geraniina i njegovog izomera u svim vrstama osim *G. robertianum* i *G. pyrenaicum*, korilagina u nadzemnim delovima *G. palustre*, *G. sanguineum*, *G. columbinum*, *G. macrorrhizum* i *G. lucidum* kao i u podzemnim delovima *G. robertianum*, *G. lucidum* i *G. pyrenaicum*, telimagrandina II u *G. lucidum* i *G. phaeum*.
 21. Multivarijantna statistička klaster analiza (UPGMA) polifenolnih sastojaka ekstrakata ukazala je na izvesnu međusobnu hemijsku sličnost ekstrakata nadzemnih delova *G. robertianum*, *G. sanguineum* i *G. columbinum*, kao i ekstrakata podzemnih organa *G. robertianum*, *G. pyrenaicum* i nadzemnog dela *G. lucidum*, dok se ekstrakt podzemnog dela *G. lucidum* odvojio od svih ostalih ispitivanih uzoraka.
 22. Antioksidantna aktivnost ekstrakata utvrđena je u *in vitro* testovima ispitivanjem redukcione i antiradikalske sposobnosti, kao i ispitivanjem uticaja na parametre oksidativnog stresa u humanom serumu.
 23. U pogledu ukupne antioksidantne, odnosno redukcione sposobnosti ekstrakata određene u FRAP testu, nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih ekstrakata i L-askorbinske kiseline, kao poznatog antioksidansa, što ukazuje na izražen antioksidantni potencijal ekstrakata.
 24. Ekstrakti podzemnih delova *G. palustre* i *G. phaeum*, koji su bili najbogatiji polifenolnim jedinjenjima, pokazali su najjaču redukcionu sposobnost sa FRAP vrednostima (8,80 i 7,02 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta, redom) većim od one za L-askorbinsku kiselinu (6,55 mmol Fe²⁺/g). Jaka redukciona sposobnost utvrđena je i za ekstrakte nadzemnih delova *G. palustre* (6,64 mmol Fe²⁺/g) i *G. sanguineum* (6,32 mmol Fe²⁺/g), kao i ekstrakt podzemnog dela *G. macrorrhizum* (6,33 mmol Fe²⁺/g).
 25. Najjaču sposobnost neutralizacije DPPH radikala pokazali su ekstrakti podzemnih i nadzemnih delova *G. palustre* (IC₅₀=4,24 µg/mL i IC₅₀=4,34 µg/mL, redom) i *G. macrorrhizum* (IC₅₀=5,34 µg/mL i IC₅₀=4,92, redom), ekstrakt podzemnog dela *G. phaeum* (IC₅₀=5,18 µg/mL) i ekstrakt nadzemnog dela *G. sanguineum* (IC₅₀=5,18 µg/mL), što je u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola i rezultatima FRAP testa.
 26. Značajan doprinos ove disertacije predstavlja i procena antioksidantnog potencijala ekstrakata ispitivanjem njihovog uticaja na parametre oksidativnog stresa u humanom serumu, kao biološki relevantnoj sredini, čime se dobijaju verodostojnije informacije o potencijalnoj primeni. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata *Geranium* vrsta na ovaj način je po prvi put urađeno u ovoj doktorskoj disertaciji.
 27. Ispitivan je uticaj ekstrakata na parametre oksidativnog stresa u serumu, i to na: totalni antioksidantni kapacitet (TAK), totalni oksidantni potencijal (TOP), prooksidantno-antioksidantni balans (PAB) i sadržaj sulfhidrilnih grupa (SHG). Ekstrakti podzemnih organa *G. macrorrhizum*, *G. phaeum*, *G. robertianum*, *G. pyrenaicum* i *G. lucidum* ispoljili su jači antioksidantni potencijal u poređenju sa poznatim antioksidansom troloksom.
 28. Na osnovu sprovedenih ispitivanja antioksidantne aktivnosti izdvojili su se ekstrakti podzemnih i nadzemnih delova *G. palustre*, *G. macrorrhizum* i *G. sanguineum* i ekstrakt

- podzemnog dela *G. phaeum*, kod kojih je zabeležena najizraženija redukciona i antiradikalska aktivnost, a ekstrakti podzemnih delova *G. macrorrhizum*, *G. phaeum*, *G. robertianum*, *G. pyrenaicum* i *G. lucidum* ispoljili su najjači antioksidantni potencijal u humanom serumu.
29. Antimikrobna aktivnost ispitivanih ekstrakata testirana je mikrodilucionom metodom na sedam standardnih sojeva Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, standardnom soju gljivice *C. albicans*, deset kliničkih izolata *E. coli* i sedam kliničkih izolata *K. pneumoniae*.
 30. Ekstrakti *G. phaeum* i *G. columbinum* nisu do sada ispitivani u pogledu antimikrobne aktivnosti.
 31. Većina ekstrakata pokazala je efekat prema svim standardnim sojevima mikroorganizama sa MIK vrednostima u opsegu 12,5-200 µg/m. Svi ekstrakti ispoljili su značajnu antimikrobnu aktivnost prema standardnim sojevima Gram pozitivne bakterije *E. faecalis* (MIK=12,5-50 µg/mL) i Gram negativnih bakterija *E. coli* (MIK=25-100 µg/mL) i *P. aeruginosa* (MIK=100 µg/mL). Najbolji efekat (MIK=12,5 µg/mL) pokazali su ekstrakti *G. phaeum* i *G. columbinum* i ekstrakt podzemnog dela *G. pyrenaicum* prema *E. faecalis*, dok su prema *E. coli* najaktivniji (MIK=25 µg/mL) bili ekstrakti nadzemnog dela *G. robertianum* i podzemnog dela *G. palustre*.
 32. Za ekstrakte nadzemnih delova *G. robertianum* i *G. columbinum* utvrđena je značajna aktivnost prema svim kliničkim izolatima *E. coli* (MIK=25-100 µg/mL). Sa druge strane, aktivnost ekstrakata prema kliničkim izolatima *K. pneumoniae* bila je slabija ili nije utvrđena (MIK≥200 µg/mL).
 33. Veoma značajan rezultat predstavlja uočena antimikrobna aktivnost ekstrakata prema standardnom soju i kliničkim izolatima Gram negativne bakterije *E. coli*, koja je jedan od najčešćih uzročnika bakterijskih infekcija, a pored toga i često rezistentna na delovanje antimikrobnih lekova.
 34. *In vitro* citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata, kao i geraniina i elagne kiselina, ispitana je MTT testom na ćelijskim linijama humanog karcinoma prostate (PC-3), kolona (HT-29), grlića materice (HeLa) i melanoma (Hs 294T) uz upotrebu doksorubicina kao pozitivne kontrole. Selektivnost testa utvrđena je ispitivanjem na zdravim ćelijama – humanim fibroblastima pluća (MRC-5).
 35. Po prvi put je ispitana citotoksičnost ekstrakata *G. phaeum*, *G. sanguineum*, *G. palustre*, *G. lucidum* i *G. columbinum*.
 36. Svi ispitivani ekstrakti ispoljili su aktivnost prema ćelijama karcinoma grlića materice (HeLa), a najefikasniji su bili ekstrakti podzemnih delova *G. sanguineum*, *G. pyrenaicum*, *G. columbinum* i *G. macrorrhizum* (IC₅₀=2,52-8,94 µg/mL). Sa druge strane, najveći broj ispitivanih ekstrakata nije ispoljio značajnu citotoksičnost prema ćelijama humanog karcinoma prostate (PC-3), kolona (HT-29) i melanoma (Hs 294T) sa izuzetkom ekstrakta nadzemnog dela *G. lucidum* koji je delovao na HT-29 ćelijsku liniju (IC₅₀=22,54 µg/mL). Gotovo svi ekstrakti su u znatno manjoj meri uzrokovali smrt zdravih ćelija fibroblasta pluća što ukazuje na njihovu selektivnost u delovanju. Slabiju selektivnost ispoljili su ekstrakti *G. lucidum* i ekstrakt nadzemnog dela *G. palustre*.
 37. Geraniin, elagni tanin prisutan u većini ispitivanih ekstrakata, takođe je ispoljio najbolje delovanje prema ćelijama karcinoma grlića materice (IC₅₀=12,88 µg/mL), uz određenu aktivnost i prema ostalim ćelijskim linijama (IC₅₀=44,41-80,94 µg/mL) i veoma izraženu selektivnost (IC₅₀>1000 µg/mL). Slabija aktivnost (IC₅₀=65,62-221,51 µg/mL) i niska selektivnost (IC₅₀=44,75 µg/mL) utvrđena je za elagnu kiselinu.

Rezultati hemijske analize doprineli su boljem poznavanju sekundarnih metabolita odabranih vrsta roda *Geranium*, ali i flore i biodiverziteta Vlasinske visoravni. Visok sadržaj polifenolnih jedinjenja, pre svega tanina, ali i flavonoidnih jedinjenja i fenolkarboksilnih kiselina, izražen antioksidantni potencijal i antimikrobna aktivnost prema određenim sojevima bakterija, kao i značajna citotoksična aktivnost prema HeLa ćelijskoj liniji karcinoma materice ukazuju na terapijski potencijal ispitivanih vrsta i opravdanost daljih istraživanja.

Sumiranjem rezultata svih ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije može se zaključiti da su se u pogledu hemijskog profila polifenolnih sastojaka nadzemnih delova i antioksidantne aktivnosti izdvojile vrste *G. macrorrhizum* i *G. palustre*, zbog delovanja na kliničke izolate Gram negativne bakterije *E. coli* dodatno i *G. robertianum* i *G. columbinum*, a u pogledu citotoksične aktivnosti i podzemni delovi *G. sanguineum*.

LITERATURA

1. Abarova S, Tancheva L, Nikolov R, Serkedjieva J, Pavlova E, Bramanti A, Nicoletti F, Tzvetkov NT. Preventive effect of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. on hepatic drug metabolism in influenza infected mice. *Sci Pharm* 2020;88(4):45.
2. Abebe E, Gugsu G, Ahmed M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *J Trop Med* 2020;2020:4674235.
3. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
4. Aedo C, Pando F. A distribution and taxonomic reference dataset of *Geranium* in the New World. *Sci Data* 2017;4(1):1-9.
5. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem* 2007;40:248-254.
6. Alghamdi F, Shakir M. The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. *Cureus* 2020;12(3):e7257.
7. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10(12):6235-6254.
8. Alonso-Salces RM, Ndjoko K, Queiroz EF, Ioset JR, Hostettmann K, Berruta LA, Gallo B, Vicente, F. On-line characterization of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A* 2014;1046:89-100.
9. Al-Sayed E, Singab AN, Ayoub N, Martiskainen O, Sinkkonen J, Pihlaja K. HPLC–PDA–ESI–MS/MS profiling and chemopreventive potential of *Eucalyptus gomphocephala* DC. *Food Chem* 2012;133(3):1017-1024.
10. Alvarez-Fernández MA, Cerezo AB, Canete-Rodríguez AM, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Composition of nonanthocyanin polyphenols in alcoholic-fermented strawberry products using LC–MS (QTRAP), high-resolution MS (UHPLC–Orbitrap–MS), LC–DAD, and antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2015;63(7):2041-2051.
11. Alves TM, Silva AF, Brandão M, Grandi TS, Smânia ED, Smânia Júnior A, Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:367-373.
12. Amaral S, Mira L, Nogueira JM, da Silva AP, Florêncio MH. Plant extracts with anti-inflammatory properties—A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure–antioxidant activity relationships. *Bioorg Med Chem* 2009;17(5):1876-1883.
13. Andriamaharavo NR. Retention Data. NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, 2014.
14. Azmi AS, Bhat SH, Hadi SM. Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: implications for anticancer properties. *FEBS Lett* 2005;579(14):3131-3135.
15. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterr Health J* 1998;4:350-360.
16. Balázs A, Tóth M, Blazics B, Héthelyi É, Szarka S, Ficsor E, Ficzek G, Lemberkovics É, Blázovics A. Investigation of dietary important components in selected red fleshed apples by GC–MS and LC–MS. *Fitoterapia* 2012;83(8):1356-1363.
17. Bate-Smith E. Ellagitannin content of leaves of *Geranium* species. *Phytochemistry* 1972;11(5):1755-1757.

18. Bauer AK, Dwyer-Nield LD, Hankin JA, Murphy RC, Malkinson AM. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. *Toxicology* 2001;169:1-5.
19. Ben Jemia M, Aidi Wannas W, Ouchikh O, Bruno M, Kchouk ME. Antioxidant activity of Tunisian *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). *Nat Prod Res* 2013;27(22):2076-2083.
20. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Ann Bot* 2003;91:179-194.
21. Bnouham M, Legssyer A, Mekhfi H, Ziyat A. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Dubai Diabetes Endocrinol J* 2002;10:33-50.
22. Bouarab Chibane L, Degraeve P, Ferhout H, Bouajila J, Oulahal N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *J Sci Food Agric* 2019;99:1457-1474.
23. Brboric J, Klisic A, Kotur-Stevuljevic J, Delogu G, Gjorgieva Ackova D, Kostic K, Dettori MA, Fabbri D, Carta P, Saso L. Natural and Natural-like Polyphenol Compounds: In Vitro Antioxidant Activity and Potential for Therapeutic Application. *Arch Med Sci* 2021;19:135379.
24. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules* 2020;25(6):1340.
25. Breuss R. *The Breuss Cancer Cure: advice for the prevention and natural treatment of cancer, leukemia, and other seemingly incurable diseases.* Book Publishing Company, New York, 1995.
26. Burbulis IE, Winkel-Shirley B. Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(22):12929-12934.
27. Cardeal ZD, Gomes da Silva MD, Marriott PJ. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20(19):2823-2836.
28. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2013;51:15-25.
29. Carocho M, Morales P, Ferreira IC. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends Food Sci Technol* 2018;71:107-120.
30. Castañeda-Arriaga R, Pérez-González A, Reina M, Alvarez-Idaboy JR, Galano A. Comprehensive investigation of the antioxidant and pro-oxidant effects of phenolic compounds: A double-edged sword in the context of oxidative stress?. *J Phys Chem B* 2018;122(23):6198-6214.
31. Catarino MD, Silva AM, Cruz MT, Cardoso SM. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Geranium robertianum* L. decoctions. *Food Funct* 2017;8(9):3355-3365.
32. Chalchat J, Petrović S, Maksimović Z, Gorunovic M. A comparative study on essential oils of *Geranium macrorrhizum* L. and *Geranium phaeum* L., Geraniaceae from Serbia. *J Essent Oil Res* 2002;14:333-335.
33. Chen HM, Wu YC, Chia YC, Chang FR, Hsu HK, Hsieh YC, Chen CC, Yuan SS. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2009;286(2):161-171.
34. Chen Y, Ren L. Studies on the anti-cancer active constituents of matsumura leafflower (*Phyllanthus matsumarae*) II. Isolation and identification of polyphenolic compounds. *Chin Tradit Herb Drugs* 1997;28(4):198-202.
35. Chung AP, Gurtu S, Chakravarthi S, Moorthy M, Palanisamy UD. Geraniin protects high-fat diet-induced oxidative stress in Sprague Dawley rats. *Front Nutr* 2018;5:17.

36. Clifford MN, Stoupi S, Kuhnert N. Profiling and characterization by LC-MS of the galloylquinic acids of green tea, tara tannin, and tannic acid. *J Agric Food Chem* 2007;55:2797-2807.
37. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - tenth edn. M07-A10. CLSI, Wayne, PA, 2015.
38. Collins FW, Bohm BA, Wilkins CK. Flavonol glycoside gallates from *Tellima grandiflora*. *Phytochemistry* 1975;14:1099-1102.
39. Council of Europe. European Pharmacopoeia 10.0. Council of Europe, Strasbourg, 2019.
40. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, Dyatmiko W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* 1997;80(4):1144-1152.
41. Custers Y. GC Volatile Components Analysis of Different Parts of *Litchi chinensis* (završni rad). Universiteit Gent-Faculteit Farmaceutische Wetenschappen, 2019.
42. Diklić N. Fam. Geraniaceae U: Flora SR Srbije IX, Uredio: Josifović M. Srpska akademija nauka i umetnosti (SANU), Beograd, 1977, str. 140.
43. Eghbaliferiz S, Iranshahi M. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytother Res* 2016;30(9):1379-1391.
44. Ekambaram SP, Perumal SS, Balakrishnan A. Scope of hydrolysable tannins as possible antimicrobial agent. *Phytother Res* 2016;30:1035-1045.
45. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.
46. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-1111.
47. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277-285.
48. Falcão SI, Vale N, Gomes P, Domingues MR, Freire C, Cardoso SM, Vilas-Boas M. Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: Uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochem Anal* 2013;24(4):309-318.
49. Falcone Ferreyra ML, Rius S, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* 2012;3:222.
50. Fang Z, Zhang M, Wang L. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.). *Food Chem* 2007;100(2):845-852.
51. Ferreira FM, Peixoto F, Nunes E, Sena C, Seiça R, Santos MS. "MitoTea": *Geranium robertianum* L. decoctions decrease blood glucose levels and improve liver mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Acta Biochim Pol* 2010;57(4):399-402.
52. Flamini G, Tebano M, Cioni PL, Bagci Y, Dural H, Ertugrul K, Uysal T, Savran A. A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey. *Pl Syst Evol* 2006;261(1-4):217-228.
53. Fodorea CS, Vlase L, Leucuta SE, Tamas M. Phytochemical study on some polyphenols of *Geranium pyrenaicum*. *Chem Nat Compd* 2005a;41:400-403.
54. Fodorea CŞ, Vlase L, Suciú S, Tămaş M, Leucuţa SE, Bersan L. HPLC Study on some Polyphenols of *Geranium macrorrhizum* L. Geraniaceae). *Analele Universităţii Ovidius, seria Ştiinţe Medicale-Farmacie* 2004;2:70-73.
55. Fodorea CS, Vlase L, Suciú S, Tamas M, Leucuta SE. Preliminary HPLC study on some polyphenols of *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2005b;109:174-178.
56. Gebarowska E, Politowicz J, Szumny A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Geranium robertianum* L. essential oil. *Acta Pol. Pharm* 2017;75:699-705.
57. Georgiev YN, Dzhambazov BM, Batsalova TG, Vasicek O, Dobрева LI, Denev PN, Danova ST, Simova SD, Wold CW, Ognyanov MH, Paulsen BS. Structural

- characterization of polysaccharides from *Geranium sanguineum* L. and their immunomodulatory effects in response to inflammatory agents. *J Ethnopharmacol* 2022;294:115390.
58. Graça VC, Barros L, Calhella RC, Dias MI, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Santos PF, Ferreira IC. Chemical characterization and bioactive properties of aqueous and organic extracts of *Geranium robertianum* L. *Food Funct* 2016a;7(9):3807-3814.
 59. Graça VC, Barros L, Calhella RC, Dias MI, Ferreira IC, Santos PF. Bio-guided fractionation of extracts of *Geranium robertianum* L.: Relationship between phenolic profile and biological activity. *Ind Crops Prod* 2017;108:543-552.
 60. Graça VC, Ferreira IC, Santos PF. Phytochemical composition and biological activities of *Geranium robertianum* L.: A review. *Ind Crops Prod* 2016b;87:363-378.
 61. Grigoraviciute G, Venskutonis PR, Cifuentes A, Ibáñez E, Álvarez-Rivera G. Pressurized liquid extraction for *Geranium macrorrhizum* leaves residue valorization and phytochemical characterization by HPLC-UV-MS/MS. *Proceedings of IX Reunión de Expertos en Tecnologías de Fluidos Comprimidos*, Madrid, 2018.
 62. Gross GG. Biosynthesis of Hydrolyzable Tannins. U: *Comprehensive Natural Product Chemistry*. Uredili: Barton D, Nakanishi K, Meth-Cohned O. Elsevier, Amsterdam, 1999, str. 799-826.
 63. Guo X, Wang H, Ni J, Liang Z, Wu X, Xue J, Wang X. Geraniin selectively promotes cytostasis and apoptosis in human colorectal cancer cells by inducing catastrophic chromosomal instability. *Mutagenesis* 2018;33(4):271-281.
 64. Habtemariam S. Medicinal foods as potential therapies for Type-2 diabetes and associated diseases: the chemical and pharmacological basis of their action. Academic Press, Cambridge, 2019, str. 109-132.
 65. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press, Oxford, 1999, str. 236.
 66. Hammami I, Triki MA, Rebai A. Chemical compositions, antibacterial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Geranium sanguineum* L. flowers. *Arch Appl Sci Res* 2011;3:135-144.
 67. Harborn J, Williams C. *Phytochemistry of genus Geranium*. U: *Geranium and Pelargonium*. Uredio Lis-Balchin M. Taylor and Francis, London and New York, 2002, str. 20-29.
 68. Harsteen B. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983;32:1141-1148.
 69. Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat Prod Rep* 1994;11:41-66.
 70. Herb M, Schramm M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity. *Antioxidants* 2021;10(2):313.
 71. Hunt CP. The emergence of enterococci as a cause of nosocomial infection. *Br J Biomed Sci* 1998;55(2):149.
 72. Ikuta KS, Swetschinski LR, Aguilar GR, Sharara F, Mestrovic T, Gray AP, Weaver ND, Wool EE, Han C, Hayoon AG, Aali A. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2022;17;400(10369):2221-2248.
 73. International Conference on Harmonisation (ICH). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, in: *ICH Harmonised Tripartite Guideline*. ICH, Geneva, 2005.
 74. Ito H. Metabolites of the ellagitannin geraniin and their antioxidant activities. *Planta Med* 2011;77(11):1110-1115.
 75. Ivancheva S, Petrova A. A chemosystematic study of eleven *Geranium* species. *Biochem Syst Ecol* 2000;28(3):255-260.

76. Ivancheva S, Stantcheva B. Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. *J Ethnopharmacol* 2000;69(2):165-172.
77. Iwasaki Y, Hirasawa T, Maruyama Y, Ishii Y, Ito R, Saito K, Umemura T, Nishikawa A, Nakazawa H. Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. *Toxicol In Vitro* 2011;25(7):1320-1327.
78. Janković MM. Fam. Geraniaceae J. St. Hill. U: Flora SR Srbije V, Uredio: Josifović M. Srpska akademija nauka i umetnosti (SANU), Beograd, 1973, str. 134-157.
79. Jarić S, Popović Z, Mačukanović-Jocić M, Djurdjević L, Mijatović M, Karadžić B, Mitrović M, Pavlović P. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J Ethnopharmacol* 2007;111(1):160-175.
80. Jensen JD, Dunn JH, Luo Y, Liu W, Fujita M, Dellavalle RP. Ellagic acid inhibits melanoma growth in vitro. *Dermatol Reports* 2011;12;3(3):e36.
81. Jerkovic I, Hegic G, Marijanovic Z, Bubalo D. Organic extractives from *Mentha* spp. honey and the bee-stomach: methyl syringate, vomifoliol, terpenediol I, hotrienol, and other compounds. *Molecules* 2010;15(4):2911-2924.
82. Jordanov D, Nikolov P, Boichinov A. *Phytotherapy. Medicina*, Sofia, 1973.
83. Jourdes M, Pouységu L, Deffieux D, Teissedre PL, Quideau S. Hydrolyzable tannins: gallotannins and ellagitannins U: Natural products. Uredili: Ramawat KG, Mérillon JM. Springe, Berlin, 2013, str. 1975-2010.
84. Kartnig T, Bucar-Stachel, J. Flavonoide aus den oberirdischen Teilen von *Geranium robertianum* (Flavonoids from the aerial parts of *Geranium robertianum*). *Planta Med* 1991;57:292-293.
85. Khanbabaee K, Van Ree T. Tannins: classification and definition. *Nat Prod Rep* 2001;18(6):641-649.
86. Khanna S, Dash PR, Darbre PD. Exposure to parabens at the concentration of maximal proliferative response increases migratory and invasive activity of human breast cancer cells in vitro. *J Appl Toxicol* 2014;34(9):1051-1059.
87. Khavrona M, Benzel I, Fedin R, Pinyazhko O. Application of extract of *Geranium palustre* herb as a dental film in the treatment of oral mucosa diseases. *Int J Pharm Sci Res* 2018;9:4849-4853.
88. Khazir J, Mir BA, Mir SA, Cowan D. Natural products as lead compounds in drug discovery. *J Asian Nat Prod Res* 2013;15:764-788.
89. Kim MH, Ha SY, Oh MH, Kim HH, Kim SR, Lee MW. Anti-oxidative and anti-proliferative activity on human prostate cancer cells lines of the phenolic compounds from *Corylopsis coreana* Uyeki. *Molecules* 2013;18(5):4876-4886.
90. Kim SJ, Kim HS, Seo YR. Understanding of ROS-inducing strategy in anticancer therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:5381692.
91. Ko H. Geraniin inhibits TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition and suppresses A549 lung cancer migration, invasion and anoikis resistance. *Bioorg Med Chem* 2015;25(17):3529-3534.
92. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, Joksic J, Sopic M, Gulan B, Janac J, Milosevic S. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis* 2015;241:192-198.
93. Kougan GB, Tabopda T, Kuete V, Verpoorte R. Simple phenols, phenolic acids, and related esters from the medicinal plants of Africa U: Medicinal Plant Research in Africa. Uredio: Kuete V. Elsevier, Oxford, 2013, str. 225-249.
94. Kukić J, Petrović S, Niketić M. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. *Biol Pharm Bull* 2006;29:725-729.
95. Kukić J, Petrović S, Pavlović M, Couladis M, Tzakou O, Niketić M. Composition of essential oil of *Stachys alpina* L. ssp. *dinarica* Murb., *Flavour Fragr J* 2006;21(3):539-542.

96. Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep* 2019;24:1-10.
97. Ky I, Le Floch A, Zeng L, Pechamat L, Jourdes M, Teissedre PL. Tannins. U: *Encyclopedia of Food and Health*. Uredili: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F. Academic Press, Oxford, 2016, str. 247-255.
98. Lansky EP, Harrison G, Froom P, Jiang WG. Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Invest New Drugs* 2005;23:121-122.
99. Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem* 2006;17:611-625.
100. Lazari DM, Skaltsa HD, Constantinidis T. Volatile constituents of *Centaurea pelia* DC., *C. thessala* Hausskn. subsp. *drakiensis* (Freyn Sint.) Georg. and *C. zuccariniana* DC. from Greece. *Flavour Fragr J* 2000; 15(1):7-11.
101. Le V, Esposito D, Grace MH, Ha D, Pham A, Bortolazzo A, Bevans Z, Kim J, Okuda R, Komarnytsky S, Lila MA. Cytotoxic effects of ellagitannins isolated from walnuts in human cancer cells. *Nutr Cancer* 2014;66(8):1304-1314.
102. Leffingwell JC, Alford ED. Volatile constituents of Perique tobacco. *Electron J Environ Agric Food Chem* 2005;4(2):899-915.
103. Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem* 2011;125:288-306.
104. Leucuta S, Vlase L, Gocan S, Radu L, Fodorea C. Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2005;28(19):3109-3117.
105. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol* 2014;9(9):1071-1081.
106. Li J, Wang S, Yin J, Pan L. Geraniin induces apoptotic cell death in human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro and in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 2013;91(12):1016-1024.
107. Li LW, Na C, Tian SY, Chen J, Ma R, Gao Y, Lou G. Ellagic acid induces HeLa cell apoptosis via regulating signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Exp Ther Med* 2018;16(1):29-36.
108. Li TM, Chen GW, Su CC, Lin JG, Yeh CC, Cheng KC, Chung JG. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res* 2005;25:971-979.
109. Lima ID. Estudos de metabolismo in vitro de extractos aquosos de São Roberto, *Geranium robertianum*: aplicações terapêuticas na doença de Alzheimer (doktorska disertacija). Universidade de Lisboa-Faculdade de Ciências, 2009.
110. Lin SS, Hung CF, Tyan YS, Yang CC, Hsia TC, Yang MD, Chung JG. Ellagic acid inhibits arylamine N-acetyltransferase activity and DNA adduct formation in human bladder tumor cell lines (T24 and TSGH 8301). *Urol Res* 2001;29:371-376.
111. Liu K, Luo M, Wei S. The bioprotective effects of polyphenols on metabolic syndrome against oxidative stress: Evidences and perspectives. *Oxid Med Cel Longev* 2019;2019:6713194.
112. Liu Z, Wang D, Chen Y, Ren L, Li K, Zhang W. Experiment studies on the pharmacodynamics experiment by corilagin. *Cancer Res Prevent Treat* 2002;29(5):356-358.
113. Lo C, Lai TY, Yang JH, Yang JS, Ma YS, Weng SW, Chen YY, Lin JG, Chung JG. Gallic acid induces apoptosis in A375. S2 human melanoma cells through caspase-dependent and-independent pathways. *Int J Oncol* 2010;37(2):377-385.
114. Lobo V, Phatak A, Chandra N. Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010;4:118-126.

115. Losso JN, Bansode RR, Trappey II A, Bawadi HA, Truax R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *J Nutr Biochem* 2004;15(11):672-678.
116. Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee MA, Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J Agric Food Chem* 2002;50:5042-5047.
117. Mabry T, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970.
118. Malik A, Afaq S, Shahid M, Akhtar K, Assiri A. Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation: A caspase-dependent pathway. *Asian Pac J Trop Med* 2011;4:550-555.
119. Mamur S, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Aksoy H. Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes in vitro. *Cytotechnology* 2012;64:553-562.
120. Mamur S, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yılmaz S. Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes? *Toxicol In vitro* 2010;24(3):790-794.
121. Maraldi T. Natural compounds as modulators of NADPH oxidases. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:271602.
122. Martono Y, Yanuarsih FF, Aminu NR, Muninggar J. Fractionation and determination of phenolic and flavonoid compound from *Moringa oleifera* leaves. *J Phys* 2019;1307:012014.
123. Mas-Bargues C, Escrivá C, Dromant M, Borrás C, Viña J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Arch Biochem Biophys* 2021;709:108941.
124. Matejić JS, Stefanović N, Ivković M, Živanović N, Marin PD, Džamić AM. Traditional uses of autochthonous medicinal and ritual plants and other remedies for health in Eastern and South-Eastern Serbia. *J Ethnopharmacol* 2020;261:113186.
125. Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4):217.
126. Mavlyanov SM, Islambekov SY, Kamaev FG, Abdullaev UA, Karimdzhanov AK, Ismailov AI. Tannins of *Geranium sanguineum*. *Chem Nat Compd* 1997;33:179-184.
127. Menković N, Šavikin K, Tasić S, Zdunić G, Stešević D, Milosavljević S, Vincek D. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J Ethnopharmacol* 2011;133(1):97-107.
128. Marčetić M. Varijabilnost sastava i biološka aktivnost etarskog ulja vrste *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae), Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2014.
129. Menković N, Šavikin K, Zdunić G, Milosavljević S, Živković J. Medicinal plants in northern Montenegro: traditional knowledge, quality, and resources. U: *Ethnobotany and Biocultural Diversities in the Balkans: Perspectives on Sustainable Rural Development and Reconciliation*. Uredili: Pieroni A, Quave CL. Springer, New York, 2014, str. 197-228.
130. Miliuskas G, van Beek TA, Venskutonis PR, Linssen JP, de Waard P. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. *Eur Food Res Technol* 2004;218(3):253-261.
131. Ming YL, Zheng ZZ, Chen LH, Zheng GH, Liu SS, Yu Y, Tong QX. Corilagin inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by inducing G2/M phase arrest. *Cell Biol Int* 2013;37(10):1046-1054.
132. Moellering Jr RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992;1173-1176.
133. Moilanen J, Koskinen P, Salminen JP. Distribution and content of ellagitannins in Finnish plant species. *Phytochemistry* 2015;116:188-197.
134. Moilanen J, Sinkkonen J, Salminen JP. Characterization of bioactive plant ellagitannins by chromatographic, spectroscopic and mass spectrometric methods. *Chemoecology* 2013;23:165-175.

135. Moreira J, Klein-Júnior LC, Cechinel Filho V, de Campos Buzzi F. Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 2013;146(1):318-323.
136. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
137. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 2001;33(1):2-16.
138. Narayanan BA, Re GG. IGF-II down regulation associated cell cycle arrest in colon cancer cells exposed to phenolic antioxidant ellagic acid. *Anticancer Res* 2001;21:359-364.
139. Nastić N, Švarc-Gajić J, Delerue-Matos C, Barroso MF, Soares C, Moreira MM, Morais S, Mašković P, Srček VG, Slivac I, Radošević K. Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. *Ind Crops Prod* 2018;111:579-589.
140. Neagu E, Paun G, Constantin D, Radu GL. Cytostatic activity of *Geranium robertianum* L. extracts processed by membrane procedures. *Arab J Chem* 2017;10:S2547-2553.
141. Neagu E, Paun G, Moroeanu V, Radu GL. Evaluation of antioxidant capacity of *Geranium robertianum* extracts. *Rev Roum Chim* 2010;55(6):32.
142. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 2016;79:629-661.
143. Nikolić T. Sistematska botanika - raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Alfa d.d., Zagreb, 2013, str. 673-675.
144. Nikolova M, Tsvetkova R, Ivancheva S. Evaluation of antioxidant activity in some Geraniacean species. *Bot Serbica* 2010;34(2):123-125.
145. O'Neill J, urednik. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Wellcome Trust & HM Government, London, 2014, str. 1-16.
146. Ochir S, Yuki T, Kanazawa T, Nishizawa M, Yamagishi T. Two galloylated flavonoids as antioxidants in *Rosa gallica* petals. *Chem Nat Compd* 2013;49:940-942.
147. Ohno Y, Fukuda K, Takemura G, Toyota M, Watanabe M, Yasuda N, Xinbin Q, Maruyama R, Akao S, Gotou K, Fujiwara T. Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells. *Anticancer Drugs* 1999;10(9):845-852.
148. Okuda T, Mori K, Hatano T. The distribution of geraniin and mallotusinic acid in the order geraniales. *Phytochemistry* 1980;19(4):547-551.
149. Okuda T, Yoshida T, Hatano T, Ikeda Y, Shingu T, Inoue T. Isolation of water-soluble tannins by centrifugal partition chromatography, and biomimetic synthesis of elaeocarpusin. *Chem Pharm Bull* 1986;34:4075-4082.
150. Okuda T, Yoshida T, Hatano T. Correlation of oxidative transformations of hydrolyzable tannins and plant evolution. *Phytochemistry* 2000; 55(6):513-529.
151. Okuda T. Geraniin, a new ellagitannin from *Geranium thunbergii*. *Tetrahedron Lett* 1976;41:3721-3722.
152. Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 2005;66(17):2012-2031.
153. Ossipov V, Salminen JP, Ossipova S, Haukioja E, Pihlaja K. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. *Biochem Syst Ecol* 2003;31(1):3-16.
154. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr Diet* 1986;44(6):307-315.
155. Özçelik B, Özgen S, Öztürk S, Küsmenoğlu Ş. Evaluation of antibacterial and antifungal activities of *Geranium pyrenaicum* L. *Turk J Pharm Sci* 2010;7(2):111-117.
156. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016;80(3):629-661.

157. Pantev A, Ivancheva S, Staneva L, Serkedjieva J. Biologically active constituents of a polyphenol extract from *Geranium sanguineum* L. with anti-influenza activity. *Z. Naturforsch, C J Biosci* 2006;61(7-8):508-516.
158. Papović O, Pljevljakušić D, Marković M. Ethnopharmacological application the plants from family Geraniaceae in the Pirot County. *Pirotski zbornik* 2021;(46):43-51.
159. Park WH. Gallic acid induces HeLa cell death via increasing GSH depletion rather than ROS levels. *Oncol Rep* 2017;37(2):1277-1283.
160. Parker N, Schneegurt M, Thi Tu AH, Foster BM, Lister P. *Microbiology* (OpenStax). OpenStax, Houston, 2016.
161. Paun G, Litescu SC, Neagu E, Tache A, Radu GL. Evaluation of *Geranium* spp., *Helleborus* spp. and *Hyssopus* spp. polyphenolic extracts inhibitory activity against urease and α -chymotrypsin. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2014;29:28-34.
162. Paun G, Neagu E, Tache A, Radu GL, Parvulescu V. Application of the nanofiltration process for concentration of polyphenolic compounds from *Geranium robertianum* and *Salvia officinalis* extracts. *Chem Biochem Eng Q* 2011;25(4):453-460.
163. Pavlova E, Simeonova L, Serkedjieva J. Antioxidant activities of *Geranium sanguineum* L. polyphenolic extract in chemiluminescent model systems. *Inorg Chem Commun* 2019;108:107518.
164. Pedro L, Pais M, Schefer J. Composition of the essential oil of *geranium robertianum* L. *Flavour Fragrance J* 1992;7:223-226.
165. Perera A, Ton SH, Palanisamy UD. Perspectives on geraniin, a multifunctional natural bioactive compound. *Trends Food Sci Technol* 2015;44(2):243-257.
166. Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability U: Tissue culture: Methods and Applications. Uredili: Kruse PF, Patterson MJ. Academic Press, New York, 1973, str. 406-408.
167. Piwowarski JP, Granica S, Zwierzyńska M, Stefańska J, Schopohl P, Melzig MF, Kiss AK. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *J Ethnopharmacol* 2014;155(1):801-809.
168. Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2018;6(4):6.
169. Popović V. Doktorska disertacija: Analiza sekundarnih metabolita i ispitivanje farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda *Laserpitium* L. (Apiaceae) (doktorska disertacija). Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Beograd, 2013.
170. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005;53(10):4290-4302.
171. Pulingam T, Parumasivam T, Gazzali AM, Sulaiman AM, Chee JY, Lakshmanan M, Chin CF, Sudesh K. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *Eur J Pharm Sci* 2022;170:106103.
172. Radulović N, Dekić M, Stojanović-Radić Z, Palić R. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil of *Geranium columbinum* L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae). *Turk J Chem* 2011;35:499-512.
173. Radulović N, Dekić M, Stojanović-Radić Z, Zoranić S. *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) essential oil: A potent agent against *Bacillus subtilis*. *Chem Biodivers* 2010;7:2783-2799.
174. Radulović N, Dekić M, Stojanović-Radić Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil of *Geranium sanguineum* L. and *G. robertianum* L. (Geraniaceae). *Med Chem Res* 2012;21:601-615.
175. Radulović N, Dekić M. Volatiles of *Geranium purpureum* Vill. and *Geranium phaeum* L.: Chemotaxonomy of Balkan *Geranium* and *Erodium* species (Geraniaceae). *Chem Biodivers* 2013;10:2042-2052.

176. Radulović NS, Stojković MB, Mitić SS, Randjelović PJ, Ilić IR, Stojanović NM, Stojanović-Radić ZZ. Exploitation of the antioxidant potential of *Geranium macrorrhizum* (Geraniaceae): hepatoprotective and antimicrobial activities. *Nat Prod Commun* 2012;7(12):1609-1614.
177. Radulović NS, Zlatković D, Dekić M, Stojanović-Radić Z. Further antibacterial *Geranium macrorrhizum* L. metabolites and synthesis of epoxygermacrones. *Chem Biodivers* 2014;11(4):542-550.
178. Radulović NS, Dorđević ND, Palic RM. Volatiles of *Pleurospermum austriacum* (L.) Hoffm. (Apiaceae). *J Serbian Chem Soc* 2010;75(12):1-11.
179. Randelović V, Zlatković B. Flora i vegetacija Vlasinske visoravni. Prirodno-matematički fakultet, Niš, 2010.
180. Renda G, Celik G, Korkmaz B, Karaoglu SA, Yayli N. Antimicrobial activity and analyses of six *Geranium* L. species with headspace spme and hydrodistillation. *J Essent Oil-Bear Plants* 2016;19(8):2003-2016.
181. Rezaei-Seresht H, Cheshomi H, Falanji F, Movahedi-Motlagh F, Hashemian M, Mireskandari E. Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An in silico and in vitro study. *Avicenna J Phytomed* 2019;9(6):574.
182. Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005;100(1-2):80-84.
183. Ruther J, Sieben S, Schricker B. Role of cuticular lipids in nestmate recognition of the European hornet *Vespa crabro* L. (Hymenoptera, Vespidae), *Insectes Soc* 1998;45(2):169-179.
184. Said Abasse K, Essien EE, Abbas M, Yu X, Xie W, Sun J, Akter L, Cote A. Association between dietary nitrate, nitrite intake, and site-specific cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 2022;14(3):666.
185. Said O, Khalil K, Fulder S, Azaizeh H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *J Ethnopharmacol* 2002;83(3):251-265.
186. Salih SH. Phytochemical Study of the *Geranium* L. in Kurdistan Region-Iraq. *Passer J Basic Appl Sci* 2019;1(1):1-3.
187. Salminen JP, Ossipov V, Loponen E, Pihlaja K. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography – mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999;864(2):283-291.
188. Samardžić S, Arsenijević J, Božić D, Milenković M, Tešević V, Maksimović, Z. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Gastroprotective Activity of *Filipendula Ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula Vulgaris* Moench. *J Ethnopharmacol* 2018;213:132-137.
189. Santos-Buelga C, García-Viguera C, Tomás-Barberán FA. On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection. U: *Methods in polyphenol analysis*. Uredili: Santos-Buelga C, Williamson G. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2003, str. 92-127.
190. Savić J, Mačukanović-Jocić M, Jarić S. Medical ethnobotany on the Javor mountain (Bosnia and Herzegovina). *Eur J Integr Med* 2019;27:52-64.
191. Sekowski S, Ionov M, Kaszuba M, Mavlyanov S, Bryszewska M, Zamaraeva M. Biophysical studies of interaction between hydrolysable tannins isolated from *Oenothera gigas* and *Geranium sanguineum* with human serum albumin. *Colloids Surf B* 2014;123:623-628.
192. Serkedjjeva J, Hay AJ. In vitro anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. *Antivir Res* 1998a;37(2):121-130.
193. Serkedjjeva J, Ivancheva S. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *J Ethnopharmacol* 1998;64(1):59-68.

194. Sharopov F, Ahmed M, Satyal P, Setzer WN, Wink M. Antioxidant activity and cytotoxicity of methanol extracts of *Geranium macrorrhizum* and chemical composition of its essential oil. *J Med Act Plants* 2017;5(2):53-58.
195. Sokmen, M., Angelova, M., Krumova, E., Pashova, S., Ivancheva, S., Sokmen, A. and Serkedjieva, J. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sci* 2005;76(25):2981-2993.
196. StatSoft Statistica (data analysis software system), version 5.1. StatSoft Inc, Tulsa, 1996.
197. Stevanović B. Praktični značaj očuvanja diverziteta biljnog sveta Jugoslavije. U: Biodiverzitet Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja, Uredili: Stevanović V, Vasić V. Biološki fakultet i Ekolibri, Beograd, 1995.
198. Stojanovic G, Palic R, Alagic S, Zekovic Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of semi-oriental tobacco, Otlja. *Flavour Fragr J* 2000;15(5):335-338.
199. Subramanian AP, Jaganathan SK, Mandal M, Supriyanto E, Muhamad II. Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2016;22(15):3952.
200. Sudjaroen Y, Hull WE, Erben G, Würtele G, Changbumrung S, Ulrich CM, Owen RW. Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour) seeds. *Phytochem* 2012;77:226-237.
201. Suffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. U: *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Uredio: Hostettmann K. Academic Press, London, 1991, str. 71-133.
202. Sun G, Zhang S, Xie Y, Zhang Z, Zhao W. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett* 2016;11(1):150-158.
203. Świątek Ł, Sieniawska E, Sinan KI, Maciejewska-Turska M, Boguszevska A, Polz-Dacewicz M, Senkardes I, Guler GO, Bibi Sadeer N, Mahomoodally MF, Zengin G. LC-ESI-QTOF-MS/MS Analysis, Cytotoxic, Antiviral, Antioxidant, and Enzyme Inhibitory Properties of Four Extracts of *Geranium pyrenaicum* Burm. f.: A Good Gift from the Natural Treasure. *Int J Mol Sci* 2021;22(14):7621.
204. Szöllösi R, Varga IS. Total antioxidant power in some species of Labiatae: Adaptation of FRAP method. *Acta Biol Szeged* 2002;46(3-4):125-127.
205. Tasić S, Šavikin K, Menković N. Vodič kroz svet lekovitog bilja. Alexandria, Beograd, 2009, str. 152-154.
206. Thitilertdech N, Chaiwut P, Saewan N. In vitro antioxidant potential of *Nephelium lappaceum* L. rind extracts and geraniin on human epidermal keratinocytes. *Biocatal Agric Biotechnol* 2020; 23:101482.
207. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(3):603-661.
208. Tucakov J. Lečenje biljem. Rad, Beograd, 1997.
209. Tuominen A, Salminen JP. Hydrolyzable tannins, flavonol glycosides, and phenolic acids show seasonal and ontogenic variation in *Geranium sylvaticum*. *J Agric Food Chem* 2017;65(31):6387-6403.
210. Tuominen A, Sinkkonen J, Karonen M, Salminen JP. Sylvatiins, acetylglucosylated hydrolysable tannins from the petals of *Geranium sylvaticum* show co-pigment effect. *Phytochemistry* 2015;115:239-251.
211. Tuominen A, Toivonen E, Mutikainen P, Salminen JP. Defensive strategies in *Geranium sylvaticum*. Part 1: Organ-specific distribution of water-soluble tannins, flavonoids and phenolic acids. *Phytochemistry* 2013;95:394-407.

212. Umesalma, S.; Nagendraprabhu, P.; Sudhandiran, G. Ellagic acid inhibits proliferation and induced apoptosis via the Akt signaling pathway in HCT-15 colon adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biochem* 2015;399:303-313.
213. Van den Dool H, Kratz PD. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* 1963;11:463-471.
214. Vaquero MR, Serravalle LT, De Nadra MM, De Saad AS. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control* 2010; 21:779-785.
215. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 1998;46:4113-4117.
216. Wafa N, Sofiane G, Ouarda D. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities valorisation of methanol extract of two *Geranium* species growth in Setif Algeria. *Int J Pharma Res Health Sci* 2017;5(3):1698-1702.
217. Wang X, Chen Z, Li X, Jiang ZK, Zhao YQ, Ping FF. Geraniin suppresses ovarian cancer growth through inhibition of NF- κ B activation and downregulation of Mcl-1 expression. *J Biochem Mol Toxicol* 2017;31(9):e21929.
218. Webb DA, Heywood VH. *Geranium* L. U: Flora Europaea, Vol 2. Uredili: Tutin TG, Heywood VH, Burges VH, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. Cambridge University Press, Cambridge, 1968, str. 193-198.
219. Woodford N. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. *J Med. Microbiol* 1998;47:849-862.
220. Wu HY, Lin TK, Kuo HM, Huang YL, Liou CW, Wang PW, Chuang JH, Huang ST. *Phyllanthus urinaria* induces apoptosis in human osteosarcoma 143B cells via activation of Fas/FasL-and mitochondria-mediated pathways. *Evid Based Complement Alternat. Med* 2012;2012: 925824.
221. Xu Z, Deng M. Geraniaceae. U: Identification and Control of Common Weeds, Vol. 2. Uredili: Xu Z, Deng M. Springer, Dordrecht, 2017, str. 629-637.
222. Yakubu OF, Adebayo AH, Dokunmu TM, Zhang YJ, Iweala EE. Cytotoxic effects of compounds isolated from *Ricinodendron heudelotii*. *Molecules* 2019;24(1):145.
223. Yeo PF. Fruit-discharge-type in *Geranium* (Geraniaceae): its use in classification and its evolutionary implications. *Bot J Linn Soc* 1984;89(1):1-36.
224. Yi ZC, Liu YZ, Li HX, Yin Y, Zhuang FY, Fan YB, Wang Z. Tellimagrandin I enhances gap junctional communication and attenuates the tumor phenotype of human cervical carcinoma HeLa cells in vitro. *Cancer Lett* 2006;242(1):77-87.
225. Zaikin VG, Borisov RS. Chromatographic-mass spectrometric analysis of Fishcer-Tropsch synthesis products. *J Anal Chem USSR (Engl. Transl.)* 2002;57(6):544-551.
226. Zeng YX, Zhao CX, Liang YZ, Yang H, Fang HZ, Yi LZ, Zeng ZD. Comparative analysis of volatile components from *Clematis* species growing in China. *Anal Chim Acta* 2007;595(1-2):328-339.
227. Zengin G, Mahomoodally MF, Picot-Allain MCN, Sinan KI, Ak G, Etienne OK, Sieniawska E, Maciejewska-Turska M, Świątek Ł, Rajtar B. Chemical composition, biological properties and bioinformatics analysis of two *Caesalpinia* species: A new light in the road from nature to pharmacy shelf. *J Pharm Biomed Anal* 2021;198:114018.
228. Zhai JW, Gao C, Ma WD, Wang W, Yao LP, Xia XX, Luo M, Zu YG, Fu YJ. Geraniin induces apoptosis of human breast cancer cells MCF-7 via ROS-mediated stimulation of p38 MAPK. *Toxicol Mech Methods* 2016;26(5):311-318.
229. Zhao CX, Li XN, Liang YZ, Fang HZ, Huang LF, Guo FQ. Comparative analysis of chemical components of essential oils from different samples of *Rhododendron* with the help of chemometrics methods. *Chemom Intell Lab Syst* 2006;82(1-2):218-228.

230. Zho J, Li G, Bo W, Zhou Y, Dang S, Wei J, Li X, Liu M. Multiple effects of ellagic acid on human colorectal carcinoma cells identified by gene expression profile analysis. *Int J Oncol* 2017;50:613-621.
231. Zhou L, Elias RJ. Antioxidant and Pro-Oxidant Activity of (-)epigallocatechin-3-gallate in Food Emulsions: Influence of pH and Phenolic Concentration. *Food Chem* 2013;138:1503-1509.
232. Zhu M, Dong X, Guo M. Phenolic profiling of *Duchesnea indica* combining macroporous resin chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. *Molecules* 2015;20(12):22463-22475.
233. Živković J, Ilić M, Šavikin K, Zdunić G, Ilić A, Stojković D. Traditional Use of Medicinal Plants in South-Eastern Serbia (Pčinja District): Ethnopharmacological Investigation on the Current Status and Comparison with Half a Century Old Data. *Front Pharmacol* 2020;11:1020.
234. Živković J, Ilić M, Zdunić G, Jovanović-Lješković N, Menković N, Šavikin K. Traditional use of medicinal plants in Jablanica district (south-eastern Serbia): ethnobotanical survey and comparison with scientific data. *Genet Resour Crop Evol* 2021;68(4):1655-1674.

OBJAVLJENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u dva rada u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20) i saopšteni na jednom međunarodnom i jednom naučnom skupu nacionalnog značaja.

Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20):

Ilić M, Marčetić M, Zlatković B, Lakušić B, Kovačević N, Drobac M. Chemical composition of volatiles of eight *Geranium* L. species from Vlasina plateau (South Eastern Serbia). Chem Biodivers 2020;17(2):e1900544. (M23)

Ilić M, Samardžić S, Kotur-Stevuljević J, Ušjak D, Milenković M, Kovačević N, Drobac M. Polyphenol rich extracts of *Geranium* L. species as potential natural antioxidant and antimicrobial agents. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2021;25(20):6283-6294. (M22)

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34):

Ilić M, Marčetić M, Zlatković B, Lakušić B, Kovačević N, Drobac M. Chemical composition of volatile compounds of eight *Geranium* L. species from Vlasina plateau. 7th Balkan Botanical Congress – Novi Sad, Serbia, 10-14 September 2018, p. 141.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (M64):

Ilić M, Drobac M, Marčetić M, Milenković M, Zlatković B, Kovačević N. Antimicrobial activity of eight *Geranium* L. species extracts, 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and neighboring regions, Stara Planina Mt., Serbia, June 20-23 2019, Book of abstracts, p. 171.

Biografija

Milan D. Ilić rođen je 29.10.1988. god. u Leskovcu. Gimnaziju opšteg smera „Stevan Jakovljević“ u Vlasotincu završio je prosečnom ocenom 5,00 kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“.

Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2007/08. god. Za vreme studija bio je stipendista Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije. Diplomirao je 2012. god. sa prosečnom ocenom tokom studiranja 8,78. Stručni ispit za diplomirane farmaceute položio je decembra 2013. god. Doktorske akademske studije Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, modul Farmakognozija, upisao je školske 2014/15. god.

Od aprila 2014. god. zaposlen je na Farmaceutskom fakultetu Novi Sad, Univerziteta Privredna akademija u Novom Sadu na mestu saradnika u nastavi, a zatim i asistenta.

Autor je i koautor šest radova u časopisima međunarodnog značaja (dva iz kategorije M21, tri iz kategorije M22 i jednog iz kategorije M23), šest saopštenja sa međunarodnih skupova i dva saopštenja sa nacionalnih skupova, štampanih u izvodu.

Govori engleski jezik.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милан Илић

Број индекса 26/14

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Упоредна анализа хемијског састава, антимикробне, антиоксидантне и цитотоксичне активности биљних
врста рода *Geranium* L. из југоисточне Србије

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

Потпис аутора

У Београду, 12.06.2023.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милан Илић

Број индекса 26/14

Студијски програм ДАС модул Фармакогнозија

Наслов рада Упоредна анализа хемијског састава, антимицробне, антиоксидантне и
цитотоксичне активности биљних врста рода *Geranium* L. из југоисточне Србије

Ментор проф. др Милица Дрбац, редовни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 12.06.2023.

Милан Илић

Изјава о коришћењу

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

Упоредна анализа хемијског састава, антимикробне, антиоксидантне и цитотоксичне активности биљних врста рода *Geranium* L. из југоисточне Србије

која је моје ауторско дело.

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

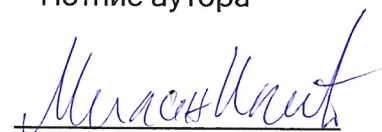
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 12.06.2023.

Потпис аутора



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

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

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

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

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

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