

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana Z. Alimpi

**Mikromorfološke karakteristike *Salvia  
amplexicaulis* Lam., *S. jurisicii* Košanin i  
*S. ringens* Sibth. & Sm. (Lamiaceae),  
hemijski sastav i biološka aktivnost  
njihovih etarskih ulja i ekstrakata**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana Z. Alimpi

**Micromorphological characteristics of  
*Salvia amplexicaulis* Lam., *S. jurisicii*  
Košanin and *S. ringens* Sibth. & Sm.  
(Lamiaceae), chemical composition and  
biological activity of their essential oils  
and extracts**

doctoral dissertation

Belgrade, 2016

Komisija za ocenu i odbranu doktorske distertacije:

---

Dr Sonja Duleti -Lauševi , vanredni profesor, mentor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

Dr Petar Marin, redovni profesor, član komisije  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

Dr Dušica Janoševi , vanredni profesor, član komisije  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

Dr Mirjana Staji , redovni profesor, član komisije  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

Dr Katarina Šavikin, naučni savetnik, član komisije  
Institut za proučavanje lekovitog bilja  
"Dr Josif Pančić"

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Verba volant, scripta manent*

- latinska izreka -

*Ova doktorska disertacija je najve im delom ura ena na Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka Instituta za botaniku i Botani ke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu uz podršku projekta „Mikromorfološka, fitohemijska i molekularna istraživanja biljaka – sistematski, ekološki i primenljivi aspekti“ (OI 173029) finansiranog od strane Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja.*

*Beskrajnu zahvalnost dugujem svom mentoru **prof. dr Sonji Duleti -Lauševi** na požrtvovanom vo enju eksperimentalnog rada i izrade disertacije, konstruktivnim diskusijama i savetima, kao i neiscrpoj profesionalnoj i bezrezervnoj prijateljskoj podršci u toku proteklih šest godina.*

*Srda no se zahvaljujem **prof. dr Petru Marinu** na savesnom vo enju terenskog rada, svesrdnoj pomo i i uvek korisnim sugestijama. Posebno se zahvaljujem **akademiku prof. dr Vladi Matevskom** na pomo i u terenskom radu i na gostoprimstvu koje nam je ukazao u R. Makedoniji.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem **prof. dr Dušici Janoševi** i **dr Snežani Budimir** koje su me na najlepši mogu i na in uvele u udesni svet mikroskopije u laboratorijama Insituta za biološka istraživanja „Siniša Stankovi “ i pružile mi ogromno profesinalno znanje i bezrezervnu podršku u toku izrade teze.*

*Srda no se zahvaljujem **prof. dr Mirjani Staji** , **prof. dr Jeleni Vukojevi** i svom kolegi i prijatelju **dr Aleksandru Kneževi u** sa Katedre algologiju, mikologiju i lihenologiju Instituta za botaniku i Botani ke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i **dr Katarini Šavikin** i kolegama sa Instituta za prou avanje lekovitog bilja „Dr Josif Pan i “ na svesrdnoj pomo i u eksperimentalnom radu i izradi disertacije. Zahvalnost dugujem i kolegama sa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Instituta za molekularnu genetiku i geneti ko inženjerstvo Univerziteta u*

*Beogradu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Katedre za ekologiju i geografiju biljaka Instituta za botaniku i Botani ke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Centra za preklini ka ispitivanja aktivnih supstanci Prirodno-matemati kog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu i Departmanu za hemiju Prirodno-matemati kog fakulteta Univerziteta u Nišu koji su široko otvorili vrata svojih laboratorija i svojim stru nim znanjem i savetima pomogli izradu ove disertacije.*

*Zahvaljujem na podršci svim kolegama sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, posebno kolegama sa Katedre za morfologiju i sistematiku, a najviše svojim dragim koleginicama **Jasmini Gradojevi** , **Kseniji Mileski** i **Ivoni Veli kovi** koje su mi u odsudnim trenucima pružile nezamenljivu podrška i ohrabrenje.*

*Najve e hvala dugujem svojoj **majci Slavici Alimpi** za beskrajnu ljubav i podršku koju mi je pružila i svom **ocu Zoranu Alimpi u** koji više nije me u nama i kome posve ujem ovaj rad. Zahvaljujem se svojoj porodici, prijateljima i svom izabraniku **Petru Aradskom** na bezrezervnoj ljubavi, podršci, strpljenju i razumevanju.*

*Autor*

**Mikromorfološke karakteristike *Salvia amplexicaulis* Lam., *S. jurisicii* Košanin i *S. ringens* Sibth. & Sm. (Lamiaceae), hemijski sastav i biološka aktivnost njihovih etarskih ulja i ekstrakata**

**SAŽETAK**

Ovo istraživanje je sprovedeno u cilju dobijanja podataka o mikromorfološkim, anatomskim i hemijskim karakteristikama i biološkim dejstvima tri vrste žalfija iz Makedonije (*Salvia amplexicaulis*, *S. jurisicii* i *S. ringens*). Uzorci navedenih vrsta potvrđeni su mikromorfološkim, anatomskim i citološkim analizama po prvi put, a zatim je sprovedeno sveobuhvatno ispitivanje hemijskog sastava i antioksidativne, antimikrobne, citotoksi ne i antineurodegenerativne aktivnosti njihovih etarskih ulja i ekstrakata.

Mikromorfološke, anatomske i citološke analize vegetativnih i generativnih organa odabranih biljaka izvedene su upotrebom svetlosne i elektronske mikroskopije (skeniraju e i transmisione). Analizirane vrste poseduju bifacijalne, hipostromati ne ili amfistomati ne listove sa stomama paracitnog tipa i kolenhimom distribuiranim uz glavni nerv na abaksijalnoj strani. *S. jurisicii* i *S. amplexicaulis* poseduju etvorougona, a *S. ringens* okruglo stablo. Vegetativni i generativni organi analiziranih vrsta nose raznovrsne neglandularne i glandularne - peltatne, kapitatne i digitiformne trihome. Broj elija sekretorne glavice peltatnih trihoma je varirao me u analiziranim vrstama. „Niske“ kapitatne trihome (Tip I) su uo ene kod sve tri vrste, dok su „visoke“ kapitatne trihome (Tip II) bile prisutne samo na cvetnim delovima *S. ringens*. Digitiformne trihome su na ene na listovima *S. ringens* i *S. jurisicii*. Orašice *S. jurisicii* i *S. ringens* su bile sferi nog, a *S. amplexicaulis* prolavno-sferi nog oblika, dok je ornamentacija površine orašica sve tri vrste okarakterisana kao retikulatna. Sitnije orašice *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* su osluznjavale nakon 15 minuta, a krupnije orašice *S. ringens* tek nakon 45 minuta. *S. ringens* poseduje heksakolpatna, radijalno simetri na i izopolarna polenova zrna, prolavnog oblika i sa

biretikulatnom ornamentacijom egzine. U bazi plodnika *S. ringens* su uo ljive floralne nektarije u obliku prstena.

Na osnovu GC-FID i GC-MS je pokazano da se etarska ulja *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* uglavnom sastoje od oksidovanih seskviterpena, dok su u ulju *S. ringens* dominantni oksidovani monoterpeni. Ekstrakti su dobijeni individualnom (voda, etanol, heksan) i sukcesivnom ekstrakcijom (dihlorometan, etil acetat i metanol). Prinos i spektrofotometrijski izmereni sadržaj ukupnih fenola je bio najviši u slu aju vodenih i alkoholnih ekstrakata svih vrsta, dok su etil acetatni ekstrakti pokazali najviši sadržaj flavonoida. Ekstrakti kompletnih nadzemnih delova i listova sadržali su znatno više ukupnih fenola i flavonoida u odnosu na ekstrakte cvetova i stabala. Nisu prime ene zna ajne varijacije u sadržaju ukupnih fenola i flavonoida u dve uzastopne sezone. Sastav fenolnih komponenti u pet tipova ekstrakata istraživanih vrsta je analiziran pomo u HPLC-DAD ime je najve i broj fenolnih komponenti idenifikovan u metanolnim ekstraktima, za kojima slede etanolni i vodeni ekstrakti. Kafena i ruzmarinska kiselina su u najve em procentu bile prisutne kod *S. ringens*, dok su me u flavonoidima najzastupljeniji bili glikozidi kempferola.

Antioksidativna aktivnost je procenjena pomo u etiri spektrofotometrijska testa: DPPH, ABTS, FRAP i  $\beta$ -karoten/linolna kiselina test. Pojedini vodeni i alkoholni ekstrakti *S. amplexicaulis* i *S. ringens* su redukovali DPPH radikal efikasnije od standardnog antioksidansa BHT ( $IC_{50} < 17,94 \mu\text{g/mL}$ ), dok se etarsko ulje *S. ringens* pokazalo višestruko slabijim u odnosu na ekstrakte ove biljke. Ekstrakti su pokazali slabije dejstvo u odnosu na standardne antioksidanse u ABTS i FRAP testu. Etanolni i vodeni ekstrakti *S. ringens* su se pokazali efikasnijim od standardnih antioksidanasa u  $\beta$ -karoten/linolna kiselina testu. Ekstrakti listova i kompletnih nadzemnih delova su ispoljili viši antioksidativni kapacitet u pore enju sa ekstraktima cvetova i stabala. Antioksidativna aktivnost je ja e korelisana sa spektrofotometrijski izmerenim sadržajem ukupnih fenola, dok je korelacija sa rezultatima HPLC-DAD analize bila ja a u slu aju flavonoida, posebno glikozida kempferola. Najviši koeficijenti korelacije su utvr eni za parove testova DPPH/ABTS i ABTS/FRAP. Etanolni i vodeni ekstrakti svih biljaka i etarsko ulje *S. ringens* su ispoljili antimikrobno dejstvo u

mikrodilucionom testu koje je bilo znatno slabije u pore enju sa streptomycinom i ketokonazolom. Najsenzitivnije bakterije su bile *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus* i *Bacillus cereus*, a mikromicete *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus glaucus* i pojedine vrste *Candida*. Citotoksi ni potencijal etanolnih i vodenih ekstrakata prou avanih vrsta je procenjen MTT testom, gde se najefikasnijim pokazao vodeni ekstrakt *S. ringens* protiv HCT-116 elijske linije kolorektalnog karcinoma ( $IC_{50}=9,83 \mu\text{g/mL}$ ). Na testiranim koncentracijama, etanolni i vodeni ekstrakti testiranih vrsta su se pokazali slabijim inhibitorima acetilholinesteraze u odnosu na galantamin, ali znatno efikasnijim inhibitorima tirozinaze u pore enju sa koji nom kiselinom.

Pojedini ekstrakti *S. ringens* i *S. amplexicaulis* predstavljaju obe avaju i izvor fenolnih jedinjenja koji mogu na i primenu kao antioksidansi, citotoksi ni agensi i inhibitori tirozinaze.

**Ključne reči:** *Salvia amplexicaulis*, *Salvia jurisicii*, *Salvia ringens*, žalfija, mikromorfologija, anatomija, trihome, etarska ulja, ekstrakti, biološke aktivnosti

**Nau na oblast:** Biologija

**Uža nau na oblast:** Morfologija, fitohemija i sistematika biljaka

**UDK broj:** 582.929.4: [581.4 + 581.192: [581.135.5 + 58: 615.451.1]: [615.277 + 615.281/.282 + 615.355]] (043.3)



**Micromorphological characteristics of *Salvia amplexicaulis* Lam., *S. jurisicii* Košanin and *S. ringens* Sibth. & Sm. (Lamiaceae), chemical composition and biological activity of their essential oils and extracts**

**ABSTRACT**

This study was carried out in order to obtain data on anatomical, micromorphological and phytochemical characteristics as well as biological activities of three sage species originating from Macedonia (*Salvia amplexicaulis*, *S. jurisicii* and *S. ringens*). Plant material of these species was analyzed from anatomical, micromorphological and cytological point of view for the first time. Subsequently, their essential oils and extracts were subjected to comprehensive investigation of chemical composition and antioxidative, antimicrobial, cytotoxic and antineurodegenerative effects.

Analyses of anatomical, micromorphological and cytological characteristics of vegetative and generative plant organs were performed using light microscopy, scanning and transmission electron microscopy. The leaves of analyzed species are bifacial, hypostomatic and amphistomatic, with paracytic stomata and collenchyma distributed in the midrib on abaxial side. Stems of *S. jurisicii* and *S. amplexicaulis* are quadriangular in cross-section, while stem of *S. ringens* is round-shaped. Vegetative and generative organs of examined species bear a variety of non-glandular and glandular trichomes, including peltate, capitate and digitiform ones. Secretory head cells varied between different species. „Short“ capitate trichomes (Type I) had been noticed in all of species, while „long“ capitate trichomes (Type II) were present only in floral parts of *S. ringens*. Digitiform trichomes were found in *S. jurisicii* and *S. ringens* leaves. *S. jurisicii* and *S. ringens* have spherical and *S. amplexicaulis* prolate-spherical nutlets. Ornamentation of nutlets surfaces were characterized as reticulate. Mixocarpy was observed 15 minutes after wetting in smaller nutlets of *S. amplexicaulis* and *S. jurisicii* and after 45 minutes in larger *S. ringens* nutlets.

Pollen grains of *S. ringens* are prolate, hexacolpate, radially symmetric, isopolar, with biretulate egzine ornamentation. Floral nectaries of *S. ringens* are ring-shaped and noticeable in the ovarial base.

GC-FID and GC-MS analyses showed that essential oils of *S. amplexicaulis* and *S. jurisicii* were mainly composed of oxygenated sesquiterpenes, while in *S. ringens* dominant class of components were oxygenated monoterpenes. The extracts were obtained using individual (water, ethanol, hexane) and successive extraction procedures (dichloromethane, ethyl acetate and methanol). The yield and spectrophotometrically determined total phenolic content were the highest in extracts obtained by water and alcohols, while the highest flavonoid contents were obtained in ethyl acetate extracts. The contents of total phenolics and flavonoids were much higher in whole plants and leaves extracts comparing to extracts of flowers and stems. No significant differences were observed in phenolic and flavonoid contents in two successive seasons. Results on phenolic composition of five types of extracts, studied using HPLC-DAD, showed that the largest number of phenolic components were present in methanol, followed by ethanol and water extracts. Extracts of *S. ringens* contained caffeic and rosmarinic acid in the highest percentage, while the most abundant flavonoids in all investigated species were kaempferol glycosides.

Antioxidant activity was evaluated using four spectrophotometric tests: DPPH, ABTS, FRAP and  $\beta$ -carotten/linoleic acid assay. Certain water and alcoholic extracts of *S. amplexicaulis* and *S. ringens* performed more efficient reduction of DPPH radical than standard antioxidant BHT ( $IC_{50} < 17,94 \mu\text{g/mL}$ ). Essential oil of *S. ringens* was significantly weaker than extracts of this plant. The tested extracts were less effective in ABTS and FRAP assays than standard antioxidants. In  $\beta$ -carotten/linoleic acid assay, ethanolic and water extracts of *S. ringens* showed stronger inhibition than standards. Whole plant and leaf extracts showed higher antioxidant capacity compared to flower and stems extracts. Antioxidant activity of extracts was strongly correlated to spectrophotometrically measured total phenolic content and flavonoid content determined by HPLC-DAD, particularly to kaempferol glycosides content. The strongest correlation was established for tests DPPH/ABTS and ABTS/FRAP. All ethanolic and water extracts and essential oil of *S.*

*ringens* showed antimicrobial effects in microdilution assay, which was weaker than those obtained for streptomycin and ketoconazole. The most sensitive bacteria were *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus* and *Bacillus cereus*, and among micromycetes *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus glaucus* and certain *Candida* species. Cytotoxic potential of ethanolic and water extracts was examined by MTT assay, where the highest efficiency showed water extract of *S. ringens* against HCT-116 colorectal carcinoma cell line (IC<sub>50</sub>=9,83 µg/mL). At tested concentrations, ethanolic and water extracts showed weaker inhibition of acetylcholinesterase than galanthamin, but stronger tyrosinase inhibition compared to kojic acid.

Several *S. ringens* and *S. amplexicaulis* extracts are shown to be promising source of phenolic components, which could be exploited as antioxidants, cytotoxic agents and tyrosinase inhibitors.

**Keywords:** *Salvia amplexicaulis*, *Salvia jurisicii*, *Salvia ringens*, sage, micromorphology, anatomy, trihomes, essential oils, extracts, biological activities

**Scientific field:** Biology

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

**UDC number:** 582.929.4: [581.4 + 581.192: [581.135.5 + 58: 615.451.1]: [615.277 + 615.281/.282 + 615.355]] (043.3)

## LISTA SKRAĆENICA:

AAE – ekvivalent askorbinske kiseline

ABTS – 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

ACh – acetilholin

AChE – acetilholinesteraza

AD – Alchajmerova bolest

ATCC – American Type Culture Collection

BA – betulinska kiselina

BEOFB – Institut za botaniku, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

BHA – butil hidroksianizol

BHT – butil hidroksitoluen

CFU – broj kolonija koje formiraju koloniju

CML – hronična mijeloidna leukemija

DHM – dihlorometan

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimetilsulfoksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

DTNB – 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzojeva kiselina)

ETAC – etil acetat

ETOH – etanol

FBS – fetal bovine serum

FCS – fetal calf serum

Fe(II)-TPTZ – fero - tripiridiltriazin

Fe(III)-TPTZ – feri - tripiridiltriazin

FRAP – metoda bazirana na redukciji Fe(III)-kompleksa u reakciji sa antioksidansom

GAE – ekvivalent galne kiseline

GC-FID – gasna hromatografija - plameno-jonizujuća detekcija

GC-MS – gasna hromatografija - masena spektrometrija

HCT-116 – ćelijska linija humanog kolorektalnog karcinoma

HPLC – tečna hromatografija pod visokim pritiskom

IC<sub>50</sub> vrednost – koncentracija uzorka koja uklanja 50% radikala i/ili inhibira preživljavanje ćelija za 50%

K562 – imortalizovana ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije

L-DOPA – 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin

MBC – minimalna baktericidna koncentracija

MEM – minimalni esencijalni medijum

MEOH – metanol

MFC – minimalna fungicidna koncentracija

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

MTT – 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid

OA – oleinska kiselina

PD – Parkinsonova bolest

pH – mera aktivnosti vodonikovih jona

QE – ekvivalent kvercetina

r – Pirsonov koeficijent korelacije

ROS – reaktivne vrste kiseonika

SAD – Sjedinjene Ameri ke Države

SDA – Saburo-dekstrozni agar

SEM – skeniraju a elektronska mikroskopija

SM – svetlosna mikroskopija

β-CB – β-karoten/linolna kiselina test

SW480 – elijska linija humanog kolorektalnog karcinoma

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

TEM – transmisiona elektronska mikroskopija

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazin

Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol

TYR – tirozinaza

UA – ursolna kiselina

UV-DAD – Ultra Violet - Diode Array Detector

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Lekovite biljke.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Familja Lamiaceae.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Morfološke, anatomske i mikromorfološke karakteristike biljaka familije Lamiaceae.....	5
1.2.2. Lekovite karakteristike i upotreba biljaka familije Lamiaceae .....	10
1.2.3. Sekundarni metaboliti i biološke aktivnosti biljaka familije Lamiaceae .....	12
1.2.3.1. Antioksidativno dejstvo biljaka familije Lamiaceae .....	18
1.2.3.2. Antimikrobno dejstvo biljaka familije Lamiaceae .....	21
1.2.3.3. Antikancerogena aktivnost biljaka familije Lamiaceae.....	24
1.2.3.4. Antineurodegenerativno dejstvo biljaka familije Lamiaceae .....	26
<b>1.3. Rod <i>Salvia</i> L. ....</b>	<b>29</b>
1.3.1. Morfološke, anatomske i mikromorfološke karakteristike vrsta roda <i>Salvia</i> .....	31
1.3.2. Lekovite karakteristike i upotreba vrsta roda <i>Salvia</i> .....	40
1.3.3. Sekundarni metaboliti vrsta roda <i>Salvia</i> .....	44
1.3.4. Biološke aktivnosti vrsta roda <i>Salvia</i> .....	48
1.3.4.1. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda <i>Salvia</i> .....	50
1.3.4.2. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda <i>Salvia</i> .....	51
1.3.4.3. Citotoksi na aktivnost etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda <i>Salvia</i> .....	52
1.3.4.4. Antineurodegenerativna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda <i>Salvia</i> .....	53
<b>1.4. Rod <i>Salvia</i> u flori Makedonije .....</b>	<b>54</b>

1.4.1. <i>Salvia amplexicaulis</i> Lam. ....	55
1.4.2. <i>Salvia jurisicii</i> Košanin .....	56
1.4.3. <i>Salvia ringens</i> Sibth. & Sm. ....	58
<b>2. CILJ RADA .....</b>	<b>60</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1. Biljni materijal .....</b>	<b>61</b>
<b>3.2. Hemikalije i reagensi .....</b>	<b>64</b>
<b>3.3. Mikroskopske analize .....</b>	<b>64</b>
3.3.1. Mikromorfološka analiza biljnog materijala binokularnom lupom .....	64
3.3.2. Svetlosna mikroskopija .....	65
3.3.3. Elektronska mikroskopija.....	65
3.3.3.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	65
3.3.3.2. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM).....	65
<b>3.4. Izolovanje i analiza sastava etarskih ulja .....</b>	<b>66</b>
<b>3.5. Priprema ekstrakata.....</b>	<b>67</b>
<b>3.6. HPLC analiza ekstrakata .....</b>	<b>68</b>
<b>3.7. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u ekstraktima .....</b>	<b>69</b>
<b>3.8. Određivanje sadržaja flavonoida u ekstraktima .....</b>	<b>69</b>
<b>3.9. Određivanje antioksidativne aktivnosti.....</b>	<b>70</b>
3.9.1. DPPH test .....	70
3.9.2. ABTS test .....	71
3.9.3. FRAP test .....	71
3.9.4. β-karoten/linolna kiselina test .....	72



<b>3.10. Određivanje antimikrobne aktivnosti.....</b>	<b>73</b>
3.10.1. Određivanje antibakterijske aktivnosti .....	73
3.10.2. Određivanje antifungalne aktivnosti .....	74
<b>3.11. Određivanje citotoksične aktivnosti.....</b>	<b>75</b>
<b>3.12. Određivanje antineurodegenerativne aktivnosti .....</b>	<b>76</b>
3.12.1. Test inhibicije acetilholinesteraze (AChE) .....	76
3.12.2. Test inhibicije tirozinaze .....	77
<b>3.13. Statistička analiza .....</b>	<b>77</b>
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1. Mikromorfološke, anatomske i citološke karakteristike proučavanjih vrsta.....</b>	<b>78</b>
4.1.1. Mikromorfološke, anatomske i citološke karakteristike <i>Salvia amplexicaulis</i> ...	78
4.1.2. Mikromorfološke, anatomske i citološke karakteristike <i>Salvia jurisicii</i> .....	85
4.1.3. Mikromorfološke, anatomske i citološke karakteristike <i>Salvia ringens</i> .....	92
<b>4.2. Hemijski sastav etarskih ulja proučavanjih vrsta.....</b>	<b>116</b>
<b>4.3. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima proučavanjih vrsta .....</b>	<b>125</b>
<b>4.4. HPLC analiza fenolnih komponenti proučavanjih vrsta .....</b>	<b>133</b>
<b>4.5. Antioksidativna aktivnost etarskog ulja i ekstrakata proučavanjih vrsta .....</b>	<b>142</b>
<b>4.6. Korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata proučavanjih vrsta .....</b>	<b>154</b>
<b>4.7. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja i ekstrakata proučavanjih vrsta .....</b>	<b>164</b>
<b>4.8. Citotoksična aktivnost ekstrakata proučavanjih vrsta.....</b>	<b>170</b>
<b>4.9. Antineurodegenerativna aktivnost ekstrakata proučavanjih vrsta .....</b>	<b>174</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>180</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>183</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Lekovite biljke

Lekovite biljke su biljke koje sintetišu biološki aktivne supstance koje pozitivno deluju na organizam zbog čega se upotrebljavaju kao terapijska sredstva (Kovačević, 2002). Stoga je razumljiva činjenica da lekovite biljke predstavljaju najstariji i najzastupljeniji vid lečenja koji je u upotrebi hiljadama godina (Kamboj, 2000; Balunas i Kinghorn, 2005; Petrovska, 2012; Omwenga i dr., 2015).

Lečenje biljkama je kod primitivnih zajednica bilo povezano sa religijskim i ritualnim obredima. Fosilni podaci govore da su ljudi koristili biljke za lečenje još u Srednjem Paleolitu, pre oko 60000 godina (Fabricant i Farnsworth, 2001). Najstariji zapisi o korišćenju biljaka u lečenju vode poreklo iz Nipura (Mesopotamija) i stari su gotovo 5000 godina. Na sumerskoj glinenoj pločici nađeno je 12 recepata sa oko 250 različitih biljaka među kojima su neke izrazito alkaloidne kao što su mak, bunika i mandragora. Zapisi o korišćenju lekovitih biljaka uključuju i njihove opise i načine upotrebe su pronađeni i kod naroda Dalekog istoka (Kineska knjiga o korenju i travama, Šen-Nung, 2737 - 2629. godine p.n.e), Indusa (Vede 2000 - 1000 godina p.n.e), Egipćana (Papyrus Ebers, 1500 godina p.n.e.), a kasnije i kod Grka i Rimljana (Cragg i Newman, 2002; Kovačević, 2002; Janick, 2003; Petrovska, 2012) (Slika 1).



**Slika 1.** Glinena pločica iz Nipura nastala oko 2100. godine p.n.e (levo) i Papyrus Ebers iz 1530. godine p.n.e. (desno) (Janick, 2003).

Grčki filozof Herodot je prvi ukazao na vezu između ugrađene piramide i belog i crnog luka (*Allium sativum* i *Allium cepa*), koji su se prema zapisu na piramidama, koristili u ishrani kako bi graditeljima dali snagu za težak fizički rad. Pitagora je 600-tih godina p.n.e. podučavao svoje učenike o načinima lečenja uz pomoć lekovitih biljaka, a veliki doprinos dali i filozof i prirodnjak Teofrast (oko 300 godina p.n.e) kao i filozof Dioskorid (100 godina), tvorac dela *De Materia Medica* (Cragg i Newman, 2002; Janick, 2003). Galenska farmacija je nastala u starom Rimu zahvaljujući Galenu (130 - 200 godine) koji je još pre 1800 godina zapisao recept biljne kreme za lice (pomade) koji i danas ima osnovu savremenih krema (Cragg i Newman, 2002; Petrovska, 2012).

U srednjem veku (VI - XII vek) se lečenje, izrada lekova kao i gajenje lekovitog i aromatičnog bilja obavljalo u manastirima u Engleskoj, Irskoj, Francuskoj i Nemačkoj (Cragg i Newman, 2002; Kovačević, 2002). Arabljani su preuzeli deo grčko-rimske ekspertize i proširili ih znanjima iz Kine i Indije koja su im tada bila na raspolaganju. Poznati persijski polimat Avicena (980 - 1037. godine) je objedinio svoja znanja iz farmacije i medicine u delu *Canon Medicae*. Farmacija kao naučna disciplina počinje da se razvija posle Francuske revolucije u vreme Lavoazijera, Šelea, Pristlija i drugih (Cragg i Newman, 2002; Kovačević, 2002).

U VII veku su slovenski narodi koristili niz različitih biljaka, kao što su ruzmarin, bosiljak i perunika u kozmetici, beli luk kao lek, emeriku, krastavac, koprivu, hajduku travu, cvet lavande i cvet zove protiv insekata, a jedi kao otrov za strele u lovu (Petrovska, 2012). Značajni medicinski spisi sa našeg podneblja su Hodoški kodeks (XIV vek) i Hilendarski medicinski kodeks (XV i XVI vek) (Kovačević, 2002; Jarić i dr., 2011).

Upotreba biljaka ima osnovu sofisticiranog sistema tradicionalne medicine koji opstaje hiljadama godina u mnogobrojnim kulturama širom sveta (Cragg i Newman, 2002). Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2008. godine, termin "tradicionalna medicina" se odnosi na ukupna znanja, veštine i praksu koje se baziraju na autohtonim teorijama, verovanjima i iskustvima različitih kultura koje se koriste u cilju prevencije, dijagnoze i terapije fizičkih i mentalnih bolesti (Omwenga i dr., 2015). Proučavanjem znanja ljudskih zajednica o biljnom svetu bavi se etnobotanika, korišćenjem

biljaka u le enju etnomedicina ili etnobotani ka medicina, a biološkom aktivnoš u narodnih lekova i otkrivanjem novih lekova etnofarmakologija. Etnofarmakologija se bazira na botanici, hemiji, biohemiji, farmakologiji, ali i antropologiji, istoriji, arheologiji i lingvistici sa ciljem primene ovih znanja u medicinske svrhe (Fabricant i Farnsworth, 2001).

Svetska zdravstvena organizacija procenjuje da oko 80% svetske populacije koristi tradicionalnu medicinu u pojedinim aspektima primarne zdravstvene nege (Kamboj, 2000; Cragg i Newman, 2002; Omwenga i dr., 2015). Ovaj podatak može biti objašnjen dostupnoš u biljaka, pristupa noš u cena u pore enju sa konvencionalnim lekovima, jednostavnim gajanjem i preradom, ali pre svega odsustvom nuspojava i na zdravlje i na životnu sredinu za razliku od komercijalnih lekova, kozmeti kih preparata i konzervanasa koji se koriste u prehrambenoj industriji (Kamboj, 2000; Omwenga i dr., 2015). Hemijska jedinjenja prisutna u biljci, odnosno biljnom leku su deo fizioloških funkcija živih sistema i stoga se veruje da imaju bolju kompatibilnost sa ljudskim organizmom (Kamboj, 2000).

Lekovite biljke su primarno koriš ene za pripremu tinktura, ajeva, kataplazmi i praškova i drugih jednostavnih biljnih formulacija (Balunas i Kinghorn, 2005). Aktivna jedinjenja lekovitih biljaka se izoluju i karakterišu po ev od 1816. godine kada je analgetik morfin prvi put izolovan iz opijumskog maka (*Papaver somniferum*), biljke koriš ene još u drevnoj Mesopotamiji (Cragg i Newman, 2002; Balunas i Kinghorn, 2005). Kinin i artemizinin koji su se tradicionalno koristili protiv malarije izolovani su iz kore vrsta roda *Cinchona* koje su domoroci Amazonije koristili za le enje groznice, odnosno iz *Artemisia annua*. Rezerpin, jedinjenje sa antihipertenzivnim dejstvom koje se koristi u indijskoj ajuverdi, dobijen je iz *Rauwolfia serpentine*, efedrin koji se u Kini koristi protiv astme iz *Ephedra sinica*, a tubokurarin koji se od davnina koristi u Amazoniji kao miorelaksans iz vrsta rodova *Chondrodendron* i *Curarea* (Cragg i Newman, 2002).

Farmaceutske kompanije su zainteresovane za što brže i što efikasnije metode kojima se dolazi do aktivnih sastojaka novih lekova, kao što su metode sinteti ke i kombinatorne hemije i molekularnog modelovanja (Balunas i Kinghorn, 2005). Me utim, smanjenje efikasnosti sinteti kih lekova i pojava brojnih kontraindikacija koje mogu biti

opasnije nego bolest koju ovi lekovi treba da izleče u inila je ponovo aktuelnim istraživanja i korišćenje prirodnih lekova u razvijenom svetu (Kamboj, 2000; Petrovska, 2012).

Put od lekovite biljke do otkrića leka obuhvata nekoliko faza. Na samom početku, botanikar, biljni ekolog, etnobotanikar ili etnofarmakolog prikuplja biljni materijal vrste poznate u tradicionalnoj medicini ili veliki broj taksona sa ciljem skrininga njihovih bioloških aktivnosti. Nakon toga fitohemičari pripremaju biljne ekstrakte, testiraju aktivnosti i izoluju i karakterišu aktivne komponente, a molekularni biolozi otkrivaju i razjašnjavaju mehanizme njihovog dejstva. Farmakognozija objedinjuje ova polja istraživanja u jedinstvenu interdisciplinarnu nauku (Balunas i Kinghorn, 2005).

### 1.2. Familja Lamiaceae

Familija Lamiaceae Martinov (Labiatae Adans., usnatice) je jedna od najvećih, kosmopolitski rasprostranjenih familija cvetnica sa više od 7200 vrsta svrstanih u 240 rodova od kojih su najbrojniji *Salvia* (900 vrsta), *Scutellaria* (360 vrsta), *Stachys* (300 vrsta), *Plectranthus* (300 vrsta), *Hyptis* (280 vrsta), *Teucrium* (250 vrsta), *Vitex* (250 vrsta), *Thymus* (220 vrsta) i *Nepeta* (200 vrsta) (Harley i dr., 2004).

Erdtman je 1945. godine na osnovu broja jedara i broja apertura polenovog zrna podelio familiju Lamiaceae na dve podfamilije, Lamioideae i Nepetoideae. Usled razvoja molekularne sistematike, podfamilija Lamioideae je značajno promenjena u odnosu na Erdtman-ovu klasifikaciju, dok je podfamilija Nepetoideae bila konstantno podržana kao monofiletska grupa na osnovu morfoloških i molekularnih dokaza (Moon i dr., 2008a).

Vrste ove familije uglavnom naseljavaju suva, dobro osunčana staništa širom sveta, sa izuzetkom najhladnijih polarnih regiona, a najveća diverzitet je u tropskim i umerenim oblastima, posebno u Mediteranu, Maloj i centralnoj Aziji gde postoji sezonska smena klime (Walker i Sytsma, 2007; Raja, 2012). Veoma su aromatične usled prisustva etarskih ulja koja regulišu transpiraciju i štite ih od preteranog zagrevanja (Marin, 2003; Raja, 2012). Ova familija obuhvata jednogodišnje i višegodišnje vrste, čija se raznovrsnost formira od visokih drvenastih biljaka poput tikovine (*Tectona grandis*) do polužbunstih,

žbunastih i zeljastih vrsta. Ipak, najveći i broj predstavnika su višegodišnje zeljaste biljke (perene) (Moon i dr., 2008a).

U podfamiliji Nepetoideae su izdvojena tri tribusa - Elsholtzieae, Mentheae i Ocimeae od kojih je najveći i ekonomski najznačajniji Mentheae koji obuhvata tri subtribusa (Salviinae, Menthinae i Nepetinae) sa oko 65 rodova i 2300 vrsta (Harley i dr., 2004; Moon i dr., 2008a; Drew i Sytsma, 2012). Usled produkcije eteričnih ulja, mnogobrojne vrste iz tribusa Mentheae su izrazito aromatične i zbog toga široko korišćene kao lekovite biljke i začin, kao što su matičnjak (*Melissa*), divlji bergamot (*Monarda*), macina trava (*Nepeta*), nana (*Mentha*), origano i majoran (*Origanum*), ružmarin (*Rosmarinus*), žalfija (*Salvia*), ubar, rđanski aj (*Satureja*), majčina dušica i timijan (*Thymus*), bosiljak (*Ocimum*) (Moon i dr., 2008a; Drew i Sytsma, 2012; Raja, 2012).

### 1.2.1. Morfološke, anatomske i mikromorfološke karakteristike biljaka familije Lamiaceae

Korenov sistem biljaka ove familije je dobro razvijen, po tipu osovinjski, sa glavnim i velikim brojem bočnih korenova (Raja, 2012). Na poprečnom preseku glavnog korena se mogu uočiti periderm, sekundarna kora i sekundarno drvo. Kora se sastoji od 5 - 10 slojeva parenhimskih ćelija, floemskih elemenata i manje ili više uočljivih grupica sklerenhimskih vlakana, dok je sekundarno drvo izgrađeno od ksilemskih elemenata između kojih se nalaze sržni zruci. Kambijalni prsten je slab uočljiv, a srž je slab razvijena (Özkan i Soy, 2007; Özkan i dr., 2008; Baran i Özdemir, 2009; Çelep i dr., 2011; Shirsat i dr., 2012).

Stablo biljaka iz familije Lamiaceae može biti uspravno (nadmerno) ili položeno (delimično iznad zemljišta ili podzemno). Podzemna stabla (rizomi) se razvijaju kod višegodišnjih predstavnika i oplutnjavela su na površini (Ifrim i Toma, 2004). Nadzemno stablo je manje ili više razgranato, četvorougono, ređe okruglo na poprečnom preseku (Lakušić i dr., 2010; Raja, 2012). Na površini nadzemnog stabla se nalazi jednoslojni epidermis, sa manje ili više razvijenom kutikulom. Primarna kora je građena od uglastog kolenhima koji je distribuiran subepidermalno po uglovima stabla u obliku uzdužnih traka i

od parenhima iji poslednji sloj ine elije blago zadebljelih zidova bogate skrobom (skrobna sara) (Petkovi i dr., 2005; Lakuši i dr., 2010). Pericikl centralnog cilindra je gra en od sklerenhima (Lakuši i dr., 2010), a provodno tkivo je organizovano u obliku prstenova užeg floema i šireg ksilema, izme u kojih je manje ili više uo lživ kambijalni prsten (Petkovi i dr., 2005; Lakuši i dr., 2010; Çelep i dr., 2011). U samom centru stabla je centralna šupljina oko koje su ostaci srži (Ifrim i Toma, 2004; Petkovi i dr., 2005; Lakuši i dr., 2010; Çelep i dr., 2011; Venkateshappa i Sreenath, 2013).

Listovi su obi no sa dobro razvijenom lisnom drškom, a obod lamine može biti ceo, testerast, grubo ili samo delimi no nazubljen, mada postoje predstavnici sa perasto use enim obodima liski. Raspore eni su naspramno, sa dva lista u pršljenu - dekusirani (unakrsni) raspored listova (Petkovi i dr., 2005; Raja, 2012). Zalisci nisu razvijeni, nervatura je mrežasto-perasta (Baran i Özdemir, 2009). Listovi su bifacijalni, odnosno na popre nom preseku se mogu razlikovati epidermis lica i epidermis nali ja izme u kojih se nalazi mezofil. elije epidermisa lica su esto krupnije u odnosu na one na nali ju, dok je mezofil u tipi nom slu aju diferenciran na jedno- ili dvoslojno palisadno i višeslojno sun erasto tkivo (Çelep i dr., 2011; Moon i dr., 2009). U mezofilu se nalaze kolateralni provodni snopi i okruženi parenhimskim tkivom (Özkan i dr., 2008; Lakuši i dr., 2010). Iznad ksilema nekih *Teucrium* vrsta se mogu uo iti sekretorni idioblasti tj. uljane elije (Lakuši i dr., 2010). Listovi su amfistomati ni ili hipostomati ni, naj eš e sa anomocitnim, paracitnim i/ili diacitnim stomama (Ifrim i Toma, 2004; Moon i dr., 2009; Lakuši i dr., 2010, Venkateshappa i Sreenath, 2013).

Kod najve eg broja predstavnika familije usnatica listovi su pokriveni neglandularnim i glandularnim trihomama koji imaju mehani ku uloga odnosno sintetišu etarska ulja (Raja, 2012). Diverzitet epidermskih karaktera listova poti e od varijacija u morfologiji elija, tipova stoma i trihoma. Iako svaki karakter zasebno ima ograni enu vrednost za sistematiku, kombinacija više njih može biti relevantna, naro ito za identifikaciju vrsta (Moon i dr., 2009). Karakteri vezani za cvetni region biljke su znatno stabilniji s obzirom na ulogu u razmnožavanju, a samim tim i održavanju, rasprostriranju i proširenju areala vrste.

Ime familije „usnatice“ (Labiatae, lat. *labium* - usna) potječe od dvousnatog oblika cveta koji je karakterističan za ovu familiju (Marin, 1996). Cvetovi su pojedinačni ili skupljeni u pršljenaste klastere (Raja, 2012). Velikina cveta kod vrsta iz tribusa Mentheae varira od nekoliko milimetara (*Lepechinia dioica*) do nekoliko centimetara (*Salvia patens*), sa širokim opsegom boja kruničnih listića (Drew i Sytsma, 2012). Cvetovi su entomofilni i izrazito zigomorfni, ređe aktinomorfni, kao kod vrsta roda *Mentha*. Čašica je zvonasta ili dvousnata izgrađena od pet sraslih listića; krunicu gradi pet sraslih listića koji u donjem delu grade cev na čijem se obodu nalaze dve usne. Cvetovi su najčešće dvopolni. Prašnika je četiri, dva duža i dva kraća, a kod nekih vrsta postoje samo dva prašnika, kao kod parafiletskog roda *Salvia* (Walker i Sytsma, 2007; Drew i Sytsma, 2012).

Ova redukcija prašnika i specijalizovani mehanizam poluge prisutan kod vrsta ovog roda su jedinstveni kod cvetnica i razvijeni su u cilju povećanja uspeha polinacije (Moon i dr., 2008a,b). Još neke specijalizacije doprinose reproduktivnom uspehu biljaka ove familije, kao što su diecke biljke (*Lepechinia* spp. sect. Parviflorae), ginodiecke biljke (*Mentha* spp., *Thymus* spp. i nekoliko drugih rodova) i heterostilija (*Salvia brandegeei*) (Drew i Sytsma, 2012). Tu čak je nadvetan, građen iz dve karpelice i lažnom pregradom podeljen na 4 okca u kojima se nalazi po jedan anatropni semeni zametak. Stubičje ginobazičan i dugačak i na vrhu nosi dvorežnjovit žig (Marin, 1996). Polenova zrna su najčešće trikolpatna i heksakolpatna, na osnovu čega je 1945. godine Erdtman podelio familiju usnatice na podfamiliju Lamioideae sa trikolpatnim polenom koji se rasejava u dvoelijskom stadijumu i podfamiliju Nepetoideae sa heksakolpatnim polenom koji se rasejava u stadijumu od trielijske (Moon i dr., 2008a).

Plod je specifičan za ovu familiju i naziva se merikarpijum (podeljeni plod), jer se formira u dimernom, dvoookom plodniku koji se sekundarno deli na 4 plodičice (orašice) (Marin, 1996). Mada se termin „orašica“ uobičajeno koristi kada se govori o plodovima Lamiaceae, mnogo adekvatniji termin je „merikarp“ (Özkan i dr., 2009). Svaka orašica je obavijena tvrdim perikarpom na površini koji vrsto srasta sa tankom i opnastom semenjačom. Orašice su najčešće oblika četvrtine kruga i dorzoventralno spljoštene sa ispupčenom dorzalnom i trouglastom ventralnom stranom zbog dodirivanja sa ostalim



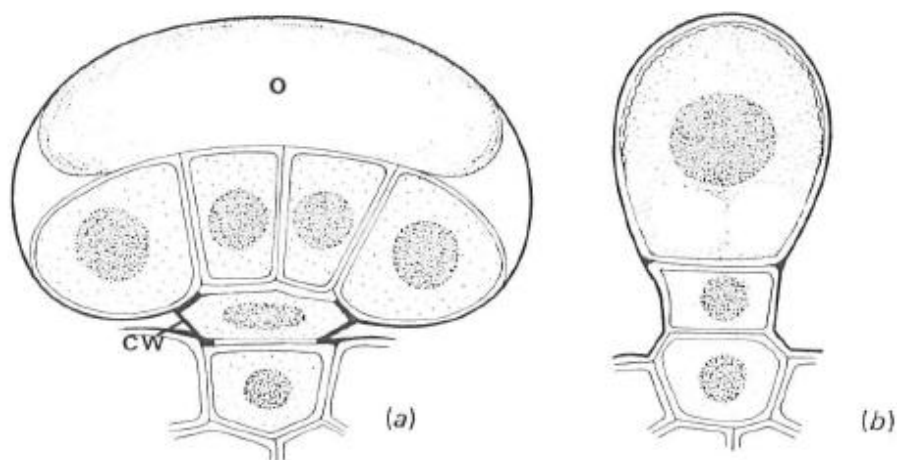
orašicama. Sem loptastog oblika (npr. *Stachys silvatica* i *Salvia officinalis*), orašice mogu biti i široko ovalne (*Melissa officinalis*) i obovalne, tj. klinaste ili štapi aste (*Phlomis tuberosa*). Boja orašica je u opsegu od sive, preko sivomrke do kestenjaste. Veli ina orašica varira izme u 0,4 i 6,0 mm (Marin, 1996).

Perikarp vrsta iz tribusa Mentheae je diferenciran na etiri osnovna dela: egzokarp, mezokarp, sklerenhim i endokarp (Ryding, 2010). U sistematskim istraživanjima usnatica najzna ajniji su izgled bazalnog i vršnog dela i ornamentacija spoljne površine orašica. Na površini se mogu na i izraštaji u vidu trihoma razli itih po obliku, dužini i položaju. Stopalni ožiljci na bazalnom delu orašice koji nastaju njenim odvajanjem od cvetne lože (*receptaculum*) su tako e vrlo zna ajni karakteri (Marin, 1996).

Vegetativni i generativni delovi ve ine predstavnika familije Lamiaceae su gusto pokriveni glandularnim i neglandularnim trihomama koje predstavljaju specijalizovane epidermske strukture (Werker, 1993; 2000). Neglandularne trihome imaju znatno ve u morfološku varijabilnost; neki tipovi su specifi ni za rod, dok su neki species-specifi ni, pa mogu poslužiti kao koristan taksonomski karakter. U tribusu Mentheae su uo ena tri tipa neglandularnih trihoma: proste jedno elijske, uniserijatne i granate (dendriformne trihome) (Moon i dr., 2009). Smatra se da neglandularne trihome imaju funkciju u spre avanju pregrevanja biljnih organa, pove avanju otpornosti na niske temperature i u rasejavanju semena (Mauricio i Rauscher, 1997; Werker, 2000), dok glandularne trihome sintetišu etarsko ulje koje pruža zaštitu od herbivora i patogena i u estvuje u privla enju insekata oprašiva a (Werker, 1993).

Studije ukazuju da tip, distribucija i gustina trihoma variraju u zavisnosti od vrste kao i organa biljaka iste vrste (Wagner, 2004). Biljke iz familije Lamiaceae poseduju dva osnovna tipa glandularnih trihoma, peltatne i kapitane (Fahn, 1988; Ascensão i dr., 1995, 1999) (Slika 2). Moon i dr. (2009) izdvajaju tri tipa glandularnih trihoma u tribusu Mentheae - kapitatne, pilatne i subsesilne (peltatne) trihome. Kapitatne trihome poseduju jedno elijsku dršku (niske kapitane trihome), a pilatne dvo- ili više elijsku dršku (visoke kapitatne trihome).

Prema Fahn (1988), peltatne trihome se sastoje iz bazalne elije u epidermisu, kratke elije drške i široke glavice sa injene od odre enog broja sekretornih elija raspore enih u jednom sloju, u jednom ili više krugova. Peltatne trihome sa 4 - 8 elija glavice su naj eš e kod tribusa *Mentheae* (multicelularna glavica - više od 10 elija prisutne kod roda *Petrovskia*) (Moon i dr., 2009).



**Slika 2.** Glandularne trihome u porodici Lamiaceae: (a) Peltatna trihoma sa sekretovanom kapi etarskog ulja (O) u subkutikularnom prostoru; CW - kutinizirani elijski zid; (b) kapitatna trihoma (Fahn, 1988).

Kapitatne trihome se sastoje od jedne bazalne elije, jedne do nekoliko elija drške i sekretorne glavice koju ini 1 - 2 elije (Fahn, 1988). Kapitatne trihome uglavnom osloba aju sekretovani materijal (uglavnom polisaharide) u spoljašnju sredinu kroz pore na kutikuli elija sekretorne glavice. Nasuprot tome, peltatne trihome akumuliraju sekretovani materijal (uglavnom etarsko ulje) u prostranom subkutikularnom prostoru i osloba aju ga pucanjem kutikule (Kaya i dr., 2007). Sa funkcionalne ta ke gledišta, Werker (1993) klasifikuje trihome na „kratkotrajne“ (po inju i završavaju sekreciju za kratko vreme) i „dugotrajne“ (akumuliraju sekretovani materijal u velikom subkutikularnom prostoru).

### 1.2.2. Lekovite karakteristike i upotreba biljaka porodice Lamiaceae

Kao izrazito aromatične, biljke porodice Lamiaceae su gajene širom sveta gde su našle široku primenu u kulinarstvu, parfimerijskoj i farmaceutskoj industriji i hortikulturi.

**Upotreba u ishrani i prehrambenoj industriji.** Listovi nekih biljaka ove porodice se vekovima koriste kao začin i prirodni konzervansi, naročito u kuhinjama mediteranskih naroda (nana, bosiljak, žalfija, majčina dušica, ruzmarin, majoran, matinjak i dr.) (Lawton, 2002; Garland, 2006; Raja, 2012). Sem listova, upotrebljava se i seme nekih biljaka, kao kod *Salvia hispanica* (chia) (Raja, 2012; Topcu i Kusman, 2014). Neke od biljaka su korišćene za izradu i aromatizaciju pića (vina, likera i sl.), kao što su matinjak sa mirisom koji podseća na limun i nana čije eterično ulje sadrži 30 - 50% mentola (Kovačević, 2002), zahvaljujući čemu se nana (pepermint) koristi kao aromatik za slatkiše, pića i paste za zube (Raja, 2012). Herba crvenog bergamota (*Monarda didyma*) služi kao zamena za mirisni kineski čaj i ima miris sličan italijanskoj bergamot pomorandži (Garland, 2006). Rimljani su koristili majčinu dušicu za aromatizaciju likera i sireva (Jarić i dr., 2015).

**Upotreba u lekovite svrhe.** Mnogobrojne biljke porodice Lamiaceae se koriste u lekovite svrhe u zvanjnoj i narodnoj medicini. *Teucrium montanum* (trava iva) i *Teucrium chamedrys* (podubica) se u tradicionalnoj medicini koriste kod digestivnih problema kao sredstvo za podsticanje apetita, lučenja žuči i olakšavanje varenja, jer sadrže gorke iridoidne glikozide (Stanković i dr., 2010, 2011a,b; Antognoni i dr., 2012; Ruiters i dr., 2016). *Sideritis scardica* (šarplaninski čaj), endemična vrsta Balkanskog poluostrva, se u narodnoj medicini koristi kao sredstvo protiv anemije, kod stomahnih tegoba, kod bronhitisa i bronhijalne astme (Todorova i Trendafilova, 2014). *Satureja montana* (rtanjski čaj, zimski ubar) pokazuje antiseptično dejstvo, pa se koristi kao začin i prirodni konzervans, a med od ove biljke se tradicionalno primenjuje kod bronhitisa. U narodnoj medicini se koristi kao "muški čaj", za odlaganje prevremene ejakulacije (Mihajilov-Krstev i dr., 2014). *Thymus serpyllum* (majčina dušica) i *T. vulgaris* (timijan) se koriste kao ekspektoransi, spazmolici kod spazma bronhija i snažni antiseptici kod upale disajnih organa zahvaljujući delovanju glavnih komponenti eteričnih ulja, karvakrolu i timolu (Nikolić i dr., 2014; Vladimir-Knežević i dr., 2014). Sastojci su čajnih mešavina i

sirupa za iskašljavanje, a spolja se koriste za ispiranje usta i grla. Vrste roda *Origanum*, od kojih su najšire korišćene *Origanum majorana* (**majoran**) i *Origanum vulgare* (**vranilovka**), se u narodnoj medicini koriste kod prehlada i kijavica, urinarnih infekcija (antimikrobno dejstvo), za poboljšanje varenja, kod bolesti jetre i žuči (spazmolitici, karminativi, holagozi), kod menstrualnih tegoba (ahin i dr., 2004). **List nane** (*Mentha piperita*) deluje spazmolitički, adstrigentno i antimikrobno što doprinosi ukupnom karminativnom efektu lista nane (Kovačević, 2002; Fatiha i dr., 2015), pa se koristi kao stomahik (sredstvo za olakšavanje varenja hrane). *Ocimum basilicum* (**bosiljak**) pokazuje jako antiseptično dejstvo, uglavnom zahvaljujući eteričnom ulju (Božin i dr., 2006), pa se *per os* primenjuje kao anthelmintik i spolja za ispiranje grla. Tulsi ili sveti bosiljak (mešavina svežih ili osušenih listova *Ocimum sanctum* i *O. basilicum*) je sakralna i najpoštovanija biljka u Hindu tradiciji (Raja, 2012). *Rosmarinus officinalis* (**ružmarin**) u eteričnom ulju sadrži 1,8-cineol (do 35%), pa se spolja primenjuje kod reumatizma, migralgija i neuralgija (rubefacijens), a sem toga deluje spazmolitički i kao holagog (Kovačević, 2002), i kao jak antiseptik (Žižović i dr., 2009). Iz lista ove biljke je prvi put izolovana ružmarinska kiselina, moćan antioksidans i antivirotik (Kovačević, 2002; Vladimir-Knežević i dr., 2014). *Salvia officinalis* (**žalfija**) je cenjena lekovita, za inska, ukrasna i medonosna biljka. U obliku vodenog ekstrakta i tinkture, list žalfije se primenjuje spolja za ispiranje i premazivanje sluznica kod zapaljenja usta i grla. Deluje antiseptično (eterično ulje), spazmolitički (flavonoidi) i adstrigentno (tanini) (Kovačević, 2002; Vladimir-Knežević i dr., 2014). Aktivni sastojci herbe i eteričnog ulja *Hyssopus officinalis* (**izop, miloduh**) olakšavaju iskašljavanje bronhijalnog sekreta i poboljšavaju varenje hrane, a sastojci eteričnog ulja deluju antiseptično, zbog čega je ulje nekada korišćeno za ritualno čišćenje hramova (Garland, 2006). *Lavandula angustifolia* (**lavanda**) deluje kao sedativ i digestiv, a cvet i eterično ulje kao insektifug (odbija insekte, naročito moljce) (Kovačević, 2002). *Leonurus cardiaca* (**srdača**) sadrži leonurin, stahidrin i druge alkaloidne, zbog čega se koristi kod hipertenzije, poremećaja srčanog ritma, kod tahikardija (Matkowski i dr., 2008a).

**Upotreba u parfimerijskoj industriji i aromaterapiji.** Etarska ulja se koriste u kozmetici, parfimerijskoj i industriji sredstava za higijenu (Kovačević, 2002; Bakkali i dr., 2008) za izradu parfema, krema, sapuna, šampona, losiona, šminke i drugih kozmetičkih proizvoda (Bakkali i dr., 2008). U tu svrhu su široko korišćena etarska ulja lavande, ružmarina i timijana (ulaze u sastav *eau de cologne*, pored etarskih ulja odabranih vrsta citrusa), pa ulija i izopa (Panda, 2003). Etarska ulja se koriste za masaže u obliku mešavina sa biljnim uljima i u kupkama (Bakkali i dr., 2008). Stari Rimljani su dodavali lavandu u vodu za kupanje, pa otuda potiče ime roda *Lavandula* (lat. *lavare* - prati). Etarska ulja se primenjuju u aromaterapiji za otklanjanje glavobolje, opuštanje i otklanjanje napetosti, i to naročito etarska ulja lavande, matičnjaka, pa ulija, ružmarina, žalfije, nane, bosiljka i dr. (Panda, 2003).

**Upotreba u hortikulturi i značaj u pčelarstvu.** Poznate ukrasne biljke pripadaju rodovima *Ajuga*, *Salvia*, *Rosmarinus*, *Thymus*, *Lavandula*, *Lamium*, *Melissa*, *Phlomis*, *Calamintha*, *Monarda*, *Stachys*, *Glechoma*, *Ocimum*. Neke vrste ovih rodova imaju izuzetno dekorativne cvetove, dok se druge gaje zbog neobičnih, šarolikih listova kakva je *Coleus* sp. (Lawton, 2002; Topcu i Kusman, 2014). Mnoge vrste ove familije su važne biljke u pčelarstvu, proizvode i nektar i polen čime omogućavaju održavanje pčelinjih društava i pravljenje meda (*Melissa*, *Salvia*, *Hyssopus*, *Glechoma*, *Monarda*, *Lamium* i dr.). Matičnjak (*Melissa officinalis*) je veoma cenjena medonosna biljka (naziv roda *Melissa* potiče od grčke reči za pčelu) (Garland, 2006). Neke vrste su poznate kao korovske biljke (*Glechoma hederacea*, *Lamium amplexicaule*, *L. maculatum*, *L. purpureum*, *Prunella vulgaris* i dr.) (Lawton, 2002).

### 1.2.3. Sekundarni metaboliti i biološke aktivnosti biljaka familije Lamiaceae

Iz lekovitih biljaka je izolovan veliki broj jedinjenja, struktura im je hemijski determinisana, a farmakološko delovanje potvrđeno. Farmakološki aktivni sastojci biljaka se svrstavaju u grupu sekundarnih metabolita (Kovačević, 2002). Prinos, sastav i intenzitet akumulacije sekundarnih metabolita u biljkama zavise od niza faktora, kao što su genotip,

fenološka faza, deo biljke iz koga se ulje izoluje, uslova staništa (geografski položaj, intenzitet svetlosti, vodni režim, nutrijenti i dr.), kao i izbor procedure za izolovanje (Božin i dr., 2006; Akkol i dr., 2008; Agostini i dr., 2009; Žižovi i dr., 2009; Ko ar i dr., 2011; Mulinacci i dr., 2011; Stagos i dr., 2012; Ben Farhat i dr., 2013a, 2014; Kontogianni i dr., 2013; Lakuši i dr., 2013; Verma i dr., 2015).

**Isparljive komponente - etarska ulja.** Kao što je pomenuto, predstavnici ove mnogobrojne familije su naj eš e izrazito aromati ni zahvaljuju i prisustvu etarskih ulja. Etarska ulja su jedinjenja intenzivnog mirisa, nerastvorljiva u vodi. Predstavljaju kompleksnu smešu razli itih isparljivih jedinjenja niske molekulske mase, iji su glavni sastojci terpeni, alifati na i aromati na jedinjenja (Kova evi , 2002; Marin, 2003, Bakkali i dr., 2008). Do sada je poznato oko 3000 etarskih ulja, od ega 300 poseduje komercijalni zna aj (Bakkali i dr., 2008). Iz biljnog materijala se izoluju destilacijom vodenom parom, hidrodestilacijom ili ekstrakcijom pomo u rastvara a (Bakkali i dr., 2008; Raut i Karuppayil, 2014).

Etarska ulja imaju niz bioloških uloga: spre avanje pregrevanja površine biljke, atraktantna (privla enje oprašiva a), repelentna (odbijanje herbivora), autopatska i alelopatska, ili deluju kao fitoaleksini (toksi ni za bakterije i mikrogljive) (Kova evi , 2002; Marin, 2003; Bakkali i dr., 2008). Prema nekim starijim klasifikacijama, familija Lamiaceae se može podeliti na dve podfamilije: Nepetoideae koje su generalno bogate etarskim uljima i Lamioideae koje su siromašne etarskim uljima, ali bogate iridoidnim glikozidima (Marin, 2003).

Ulja se sastoje iz 20 - 200 razli itih komponenti, pri emu su jedna ili dve okarakterisane kao glavne i prisutne su u izuzetno visokom procentu u odnosu na druge (20 - 70%) (Bakkali i dr., 2008). Generalno, etarska ulja biljaka familije Lamiaceae kao dominantne komponente sadrže monoterpene i seskviterpene (ugljovodonici, alkoholi, aldehidi, ketoni, fenoli, estri), i u manjem procentu diterpene, alifati ne i aromati ne komponente (Božin i dr., 2006; Bakkali i dr., 2008; Schmiderer i dr., 2008; Agostini i dr., 2009; Nikoli i dr., 2014; Raut i Karuppayil, 2014; Verma i dr., 2015).

Etarsko ulje lista nane (*Mentha piperita*) kao dominantne komponente sadrži monoterpena sa 30 - 50% mentola (Bakkali i dr., 2008). Izomerni monoterpeni fenoli karkvakrol i timol prisutni su u etarskim uljima mnogih biljaka iz porodice Lamiaceae, naročito kod rodova *Thymus* i *Origanum* (Božin i dr., 2006; Vladimir-Knežević i dr., 2014). Aldehidi citrali (geranial i neral) daju ulju mati njaka (*Melissa officinalis*) miris nalik limunu (Kovačević, 2002). Etarsko ulje herbe bosiljka (*Ocimum basilicum*) kao dominantne komponente sadrži metilheptakol (45,8%) i linalol (24,2%) (Božin i dr., 2006). List žalfije (*Salvia officinalis*) sadrži etarsko ulje sa monoterpenim ketonima - i - tujonom (30 - 60%) (Kovačević, 2002; Vladimir-Knežević i dr., 2014). Cvet lavande (*Lavandula angustifolia*) sadrži etarsko ulje bogato linalolom (25 - 28%) i linalil acetatom (25 - 45%). U etarskom ulju lista ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) dominiraju 1,8-cineol (do 35%), pinen, kamfor i borneol (Kovačević, 2002).

**Neisparljive komponente.** Neisparljivi sastojci (iridoidni glikozidi, diterpeni, triterpeni, fenolna jedinjenja, tanini i dr.) se iz biljaka izoluju ekstrakcijom rastvarača ima različite polarnosti. Postupkom standardnih procedura ekstrakcije se pomoću u odabranim rastvaračima iz biljnog tkiva izdvajaju ekstrakti u obliku kompleksne smеше metabolita, koja sadrži aktivne principe i manju ili veću količinu balastnih supstanci. Tokom ekstrakcije, rastvarač difunduje u biljni materijal i rastvaračkomponente slične polarnosti (Tiwari i dr., 2011). Postoji više tehnika ekstrakcije: maceracija, digestija, perkolacija, turboekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidima i dr. (Kovačević, 2002; Tiwari i dr., 2011), razvijenih u cilju pripreme različitih galenskih oblika (dekoti, infuzi, tečnosti, polutečnosti i vrste ekstrakti, tinkture) (Tiwari i dr., 2011).

*Iridoidni glikozidi.* Iridoidni glikozidi su neisparljivi monoterpeni derivati karakteristični za familiju Lamioideae i po pravilu odsustvuju kod Nepetoideae (Marin, 2003; Wink, 2003). Mnogi od njih su farmakološki aktivni, jer inhibiraju formiranje prostaglandina i leukotriena koji su važni medijatori inflamacije kod životinja (Wink, 2003). Glikozidi su gorke supstance koje podstiču lučenje žuči i olakšavaju varenje (na primer, teukrozid kod dubočica, *Teucrium chamaedrys*) (Antognoni i dr., 2012). Iridoidni estar nepetalakton nije glikozilovan, isparljiv je i prisutan je samo kod roda *Nepeta*

(Taskova i dr., 1997; Wink, 2003), zbog njegovog prisustva macina trava (*Nepeta cataria*) deluje kao atraktant za mačke (Clapperton i dr., 1997).

*Diterpenske komponente.* Diterpeni, izolovani iz različitih rodova usnatice, pokazuju izrazite biološke aktivnosti (Topçu i Gören, 2007) i predstavljaju veoma važne hemotaksonomske markere unutar i iznad nivoa roda (Alvarenga i dr., 2001). Uz retke izuzetke, diterpen siderol je prisutan samo kod vrsta roda *Sideritis* (Taskova i dr., 1997); salvinatorin (divinorin) A je halucinogen izolovan samo iz meksičke žalfije (*Salvia divinorum*) (Valdés, 1994); tanshionski diterpeni iz korena *Salvia miltiorhiza* deluju kao antiaritmici i kardioprotektivi (Cui i dr., 2015); labdanski derivati marubina izolovani iz herbe očajnice (*Marrubium vulgare*) su korišćeni kao stomahici i spazmolitici (Matkowski i dr., 2008a). Žalfija i ruzmarin sadrže diterpenska gorka jedinjenja - derivate karnozolne kiseline (pikrosalvin, karnozol i rosmanol) sa izrazitim antioksidativnim delovanjem (Kovačević, 2002; Vladimir-Knežević i dr., 2014). Otrovnii neoklerodanski diterpeni izolovani iz *Teucrium chamaedrys* (teukrin A i teuhamedrin) su pokazali hepatotoksičnost kod ljudi (Antognoni i dr., 2012).

*Triterpeni.* U porodici Lamiaceae su identifikovani triterpenski derivati lupana, oleana i ursana, pri čemu su oleinska, ursolna i betulinska kiselina prisutne u najvećem procentu (Jäger i dr., 2009). Triterpenske kiseline, oleinska i ursinska kiselina, su u značajnoj količini prisutne kod biljaka podfamilije Nepetoideae u odnosu na Lamioideae (Janicsák i dr., 2006). Ova grupa jedinjenja je od velikog farmakološkog značaja s obzirom da ispoljava mnogobrojne biološke aktivnosti i neznatnu toksičnost (Janicsák i dr., 2006; Jäger i dr., 2009).

*Polifenoli.* Različite fenolne komponente, posebno fenolne kiseline i flavonoidi, su veoma česti kod biljaka ove porodice (Wink, 2003). Fenolna jedinjenja su široko rasprostranjena u biljnom svetu i imaju ulogu u zaštiti biljaka od oksidativnog stresa (Lu i Foo, 2001; Marin, 2003). Čine jednu od najvećih grupa sekundarnih metabolita sa oko 8000 različitih struktura, počevši od jednostavnih kao što su fenolne kiseline, pa do visoko polimerizovanih struktura kakvi su tanini (Dai i Mumper, 2010). U biljkama porodice Lamiaceae, Zgorka i Głowniak (2001) su identifikovali dve depsidne (ruzmarinsku i



hlorogensku kiselinu) i osam prostih kiselina kao što su protokatehinska, gentizinska, *p*-hidroksibenzojeva, kafena, vanilinska, *p*-kumarna, ferulna i siringinska kiselina. Ruzmarinska kiselina je karakteristična za familiju i prisutna u velikim količinama kod npr. žalfije, matičnjaka i naročito ruzmarina iz koga je prvi put izolovana (Zgorka i Głowniak, 2001; Kovačević, 2002; Mulinacci i dr., 2011; Vladimir-Knežević i dr., 2014). Ruzmarinska kiselina je estar kafenolne kiseline i specifična fenolna komponenta usnatice koja može biti upotrebljena kao značajan hemotaksonomski marker u familiji Lamiaceae, posebno u podfamiliji Saturejoideae (Zgorka i Głowniak, 2001). Ova fenolna kiselina je cenjena kao odličan antioksidans i antivirusni i esto je sastojak preparata za tretiranje herpesne infekcije usana (Astani i dr., 2012).

Flavonoidi čine jednu od najzastupljenijih grupa biljnih fenola, za koje je poznato da pokazuju niz povoljnih efekata na zdravlje ljudi (Tapas i dr., 2008). Flavonoidi i flavonoidni heterozidi su prisutni kod familije usnatice (Taskova i dr., 1997; Vladimir-Knežević i dr., 2014) i esto su, uz ostale sastojke, nosioci aktivnosti ovih biljaka (Mulinacci i dr., 2011; Vladimir-Knežević i dr., 2014). Biljke ove familije najčešće sintetišu flavone i flavonole (Harborne i dr., 1986; Valant-Vetschera i dr., 2003; Jamzad i dr., 2003; Kharazian, 2013, 2014), kao i flavanone, izoflavone, dihidroflavonole i halkone (Kharazian, 2013, 2014). Mnogobrojni flavonoidi su prvi put izolovani iz vrsta familije usnatice - salvigenin, flavon prvi put izolovan iz *Salvia triloba*; bajkalejin i bajkalin su flavoni iz *Scutellaria baicalensis*; sideritoflavon iz roda *Sideritis*; stahiospinozid iz *Stachys spinosa*; longitin, flavanon iz *Mentha longifolia*; flomisflavozid A i B, biglikozidi iz *Phlomis spindens* i dr. Flavonoidni aglikon bajkalein i njegov glukuronid bajkalin, izolovani iz nekih vrsta roda *Scutellaria*, pokazuju antinflamatorno delovanje i podstiču sintezu kolagena i proteina u koži (Ulubelen i dr., 2005).

Većina Nepetoideae (ne i Lamiodeae) proizvodi tanine, u kojima je najčešće ruzmarinska kiselina (Wink, 2003). Tanini su moćni antiseptici i antioksidansi u biljkama korištenim u ishrani, koji u nižim dozama deluju astrigentno, dok u višim inhibiraju digestivne enzime i smanjuju bioaktivnost gvožđa i vitamina B12 (Khomdram i Singh, 2011).

*Jedinjenja sa azotom.* Ova jedinjenja su prisutna u manjoj meri i to uglavnom u podfamiliji Lamioideae, kao što su pirolidinski alkaloidi (stahidrin i betonicin) izolovani iz pojedinih vrsta *Stachys* i *Marrubium* i guanidinski alkaloidi (leonurin) iz *Leonurus cardiaca* (Wink, 2003; Matkowski i dr., 2008a; Topcu i Kusman, 2014).

Vrste familije Lamiaceae su bile objekti mnogobrojnih farmakoloških studija kojima je pokazano da njihova etarska ulja i ekstrakti pokazuju niz bioloških dejstava u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Ove biljke ispoljavaju biološke aktivnosti zahvaljuju i širokom spektru sekundarnih metabolita me u kojima su etarska ulja, fenolne kiseline i flavonoidi prepoznati kao glavne bioaktivne komponente najšire koriš enih predstavnika familije usnatica (Vladimir-Kneževi i dr., 2014). Sledi kratak pregled literaturnih podataka o biološkim dejstvima biljaka familije Lamiaceae sa detaljnijim osvrtom na antioksidativno, antimikrobno, citotoksi no i antineurodegenerativno dejstvo.

- ✂ **Antioksidativno dejstvo** (Dorman i dr., 2003; Mimica-Duki i dr., 2003, 2004; Božin i dr., 2006; Matkowski i Piotrowska, 2006, 2008a; Shan i dr., 2007; Topçu i Gören, 2007; Orhan i dr., 2007, 2012, 2013; Wojdyło i dr., 2007; Chrpova i dr., 2010; Stankovi i dr., 2010, 2011a; enol i dr., 2010a; Hussain i dr., 2011; Derakhshani i dr. 2012; Giweli i dr., 2012, 2013; Stagos i dr., 2012; Karaka i dr., 2012; Kontogianni i dr., 2013; Roby i dr., 2013; Nikoli i dr., 2014; Raut i Karuppayil, 2014; Generali -Mekini i dr., 2014; Mihajilov-Krstev i dr., 2014; Tusevski i dr., 2014; Vladimir-Kneževi i dr., 2014; Fatiha i dr., 2015);
- ✂ **Antimikrobno dejstvo** (antibakterijsko/antifungalno/antiviralno) dejstvo (González i dr., 1989; Sivropoulou i dr., 1997; Mimica-Duki i dr., 2003, 2004; Božin i dr., 2006; Shan i dr., 2007; Topçu i Gören, 2007; Žižovi i dr., 2009; Roldán i dr., 2010; Askun i dr., 2012; Astani i dr., 2012; Giweli i dr., 2012, 2013; Raja, 2012; Stagos i dr., 2012; Abedini i dr., 2013; Generali -Mekini i dr., 2014; Mihajilov-Krstev i dr., 2014; Nikoli i dr., 2014; Raut i Karuppayil, 2014; Ruiters i dr., 2016);
- ✂ **Antikancerogeno/citotoksi no/antiproliferativno dejstvo** (Sivropoulou i dr., 1997; Topçu i Gören, 2007; Al-Kalaldehy i dr., 2010; Stankovi i dr., 2011b;

- Karaka i dr., 2012; Kontogianni i dr., 2013; Raut i Karuppayil, 2014; Russo i dr., 2016);
- ✧ **Antineurodegenerativno dejstvo** (Topçu i Gören, 2007; Orhan i dr., 2007, 2012, 2013; Orhan i Arslan, 2009; enol i dr., 2010a,b; Mihajilov-Krstev i dr., 2014; Topcu i Kusman, 2014; Vladiimir-Kneževi i dr., 2014; Fatiha i dr., 2015)
  - ✧ **Antinflamatorno i antinocioceptivno dejstvo** (Bari evi i dr., 2001; Ojewole i dr., 2005; Abdel-Moein i dr., 2011);
  - ✧ **Antidijabeti no i hipoglikemijsko dejstvo** (Ojewole i dr., 2005; Bnouham i dr., 2006; Loizzo i dr., 2008; Raja, 2012);
  - ✧ **Kardiovaskularno i kardioprotektivno dejstvo** (Topçu i Gören, 2007; Cui i dr., 2015);
  - ✧ **Gastroprotektivno dejstvo** (Rozza i dr., 2013);
  - ✧ **Diuretici no dejstvo** (Krishnaiah i dr., 2011);
  - ✧ **Sedativno/anksioliti no dejstvo** (Edewor-Kuponiyyi, 2013);
  - ✧ **Antifidno/insekticidno/larvicidno** (Topçu i Gören, 2007; El-Akhal i dr., 2014).

#### *1.2.3.1. Antioksidativno dejstvo biljaka familije Lamiaceae*

**Slobodni radikali i oksidativni stres.** Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže barem jedan nespareni elektron u spoljašnjem elektronskom omotaču, zbog čega su vrlo nestabilni i reaktivni, pa se vežu za molekule sa kojima dolaze u kontakt (Vlaisavljević, 2014), posebno za proteine, lipide i nukleinske kiseline (Ames i dr., 1993; Haliwell, 2001a; Nickavar i dr., 2007). Pritom dolazi do burne lančane reakcije i brojnih oštećenja ćelija koje na taj način brže stare i ulaze u degenerativne procese (Ames i dr., 1993; Haliwell, 2001b; Vlaisavljević, 2014). Smatra se da su slobodni radikali uključeni u proces starenja (Ames i dr., 1993) i u patologiju preko 100 bolesti ljudi kao što je

ateroskleroza, kardiovaskularne bolesti, artritis, Alchajmerova i Parkinsonova bolest, kancer i druge (Halliwell, 2001b).

Reaktivne vrste kiseonika (ROS - *reactive oxygen species*) predstavljaju najznačajniju grupu slobodnih radikala u živim sistemima, u koju se ubrajaju kako radikali (superoksid anjon radikal,  $O_2^{\bullet-}$ ; hidroksil-radikal,  $OH^{\bullet}$ ; peroksil,  $RO_2^{\bullet-}$  i dr.), tako i neradikalne vrste (vodonik-peroksid,  $H_2O_2$ ; hipohlorna kiselina,  $HOCl$ ; ozon,  $O_3$  i dr.). Slobodni radikali nastaju tokom metaboličkih procesa i/ili pod uticajem fizičkih ili hemijskih faktora u okruženju, a njihov nivo kontroliše kompleksni sistem antioksidativne odbrane (Halliwell, 2001a, Vlaisavljević, 2014). Disbalans između produkcije slobodnih radikala i antioksidativne odbrane dovodi do oksidativnog stresa (Halliwell, 2001b).

**Antioksidansi i antioksidativno dejstvo.** Pod antioksidansima se podrazumevaju supstance koje mogu odložiti ili sprečiti oksidaciju supstrata kada su prisutni u niskoj koncentraciji u odnosu na koncentraciju supstrata (Halliwell, 2001a). Sistem antioksidativne odbrane je kompleksan i uključuje kako endogene, tako i egzogene antioksidanse koji se unose hranom realizuju i svoju ulogu na različite načine: (i) kao inhibitori formiranja slobodnih radikala, (ii) kao donori elektrona koji "hvataju" i neutrališu slobodne radikale, (iii) kao regulatori aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid-dismutaza i glutation-peroksidaza) (Halliwell, 2001a; Lu i Foo, 2002). Sintetički antioksidansi kao što su BHA i BHT su veoma efikasni, ali mogu delovati kancerogeno ukoliko se unose u velikim dozama tokom dužeg vremenskog perioda (Kahl i Kappus, 1993).

Veliko interesovanje savremenih istraživača je usmereno ka otkrivanju novih i efikasnih prirodnih antioksidanasa koji se mogu bezbedno koristiti u hrani, farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima. Voće, povrće i žitarice su izvori prirodnih antioksidanasa kao što su vitamin C, vitamin E, karotenoidi, fenolne kiseline, flavonoidi i drugi, dobro poznati po tome što smanjuju rizik od nastanka različitih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Halliwell, 2001b; Nickavar i dr., 2007; Wahle i dr., 2010). Mnogobrojne studije su pokazale da lekovite biljke sadrže različite komponente koje poseduju antioksidativno

dejstvo, me u kojima su fenolna jedinjenja od naročito velikog značaja imaju i u vidu njihovu biološku ulogu u biljnom organizmu.

### **Antioksidativno dejstvo etarskih ulja i ekstrakata biljaka porodice Lamiaceae.**

Koriste i različite metode za evaluaciju antioksidativne aktivnosti, mnogobrojne studije su pokazale da smeše metabolita (etarska ulja i ekstrakti) i izolovane komponente biljaka porodice Lamiaceae predstavljaju obe avajue antioksidativne agense.

Aktivne komponente antioksidativnog dejstva etarskih ulja biljaka porodice Lamiaceae su terpeni, u prvom redu različiti monoterpeni derivati. U studiji antioksidativne aktivnosti etarskih ulja tri vrste *Mentha* (Mimica-Duki i dr., 2003), najznačajniji hvatači i slobodnih radikala su bili monoterpeni ketoni (*M. longifolia* i *M. piperita*) i 1,8-cineol (*M. aquatica*). Hussain i dr. (2011) su našli da je antioksidativna aktivnost etarskih ulja četiri vrste porodice Lamiaceae slabija u odnosu na BHT, pri čemu su vrste rangirane kao: *Melisa officinalis* > *Salvia officinalis* > *Lavandula angustifolia* > *Pogostemon cablin*. Božin i dr. (2006) su saopštili da etarska ulja tri vrste usnatice neutrališu DPPH radikale sa IC<sub>50</sub> vrednostima od 0,17 µg/mL (origano) < 0,19 µg/mL (timijan) < 0,39 µg/mL (bosiljak), koje su bile niže u odnosu na BHT (5,37 µg/mL). Etarsko ulje *Satureja thymbra* iz Libije pokazalo je jaču u DPPH aktivnost u odnosu na izolovane komponente koje su IC<sub>50</sub> vrednosti bile rangirane kao karvakrol < timol < -terpinen (Giweli i dr., 2012). Antioksidativni kapacitet etarskog ulja *Thymus serpyllum* je bio veći u poređenju sa *Th. vulgaris* i *Th. algeriensis* u četiri paralelna testa (Nikolić i dr., 2014).

Među vodenim ekstraktima biljaka porodice Lamiaceae iz Srbije, najjača u antioksidativnu aktivnost merenu DPPH testom su pokazali vodeni ekstrakti *Origanum vulgare*, *Mentha x piperita* i *Melissa officinalis* što je pripisano prisustvu galne, kafene, ruzmarinske kiseline i katehina (Chrpova i dr., 2010). Etanolni ekstrakti 26 biljaka porodice Lamiaceae iz Hrvatske su delovali kao hvatači i DPPH radikala sa IC<sub>50</sub> vrednostima između 3,08 - 43,97 µg/mL, pri čemu su se najefikasnijim pokazali ekstrakti *Satureja subspicata*, *Origanum vulgare* i *Salvia officinalis* (Vladimir-Knežević i dr., 2014). Ekstrakti timijana i žalfije su se pokazali kao bolji hvatači i DPPH radikala u odnosu na ekstrakt majorana što je objašnjeno višim sadržajem cimetine, ferulone, ruzmarinske kiseline i metil-ruzmarinata u

ekstraktima ovih biljaka (Roby i dr., 2013). U studiji koja je obuhvatila nekoliko lekovitih vrsta usnatica iz Grke, Skotti i dr. (2014) su istakli da je ekstrakt matinjaka (*Melissa officinalis*) najefikasniji hvata DPPH i ABTS radikala u odnosu na ekstrakte drugih biljaka, uključujući i izop, origano, žalfiju i dr. Tri vrste roda *Mentha* iz Alžira, a posebno *M. spicata*, su pokazale značajne antioksidativne efekte u više paralelnih testova (Fatiha i dr., 2015). Antioksidativna aktivnost ekstrakata biljaka porodice Lamiaceae bila je pozitivno korelisana sa sadržajem fenolnih komponenata u mnogim istraživanjima (Woydilo i dr., 2007; Chrpova i dr., 2010; Roby i dr., 2013; Generali -Mekini i dr., 2014; Vladimir-Knežević i dr., 2014; Skotti i dr., 2014; Fatiha i dr., 2015).

### 1.2.3.2. Antimikrobno dejstvo biljaka porodice Lamiaceae

**Patogeni.** Terminom patogeni se označavaju mikroorganizmi (bakterije, mikrogljive i virusi) koji uzrokuju oboljenja biljaka, životinja i čoveka. Patogeni mogu dopeti u ljudski organizam putem digestivnog i respiratornog trakta, kao i preko oštećene kože ili sluzokože (McFadden i dr., 2003). Mikroorganizmi, u prvom redu bakterije, bućice i kvasci, dovode do kvarenja hrane (promene boje i izgleda, razvijanja neprijatnog mirisa i ukusa) što predstavlja jedan od najvećih problema u prehrambenoj industriji. Rast i metabolizam patogenih mikroorganizama u kontaminiranoj hrani dovodi do ozbiljnih intoksikacija hranom (Blackburn, 2006). Procenjeno je da je 2000. godine 2,1 miliona ljudi širom sveta preminulo od posledica dijareje, koja je najvećim delom izazvana kontaminacijama hrane i pića i vode (Nedorostova i dr., 2009).

Neki od najpoznatijih bakterijskih patogena koji se mogu naći u hrani su sojevi *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*) (uzročnici trovanja hranom, povraćanja i stomahnih problema), *Escherichia coli* (uzročnik trovanja hranom, dijareja i infekcije urinarnog trakta), *Listeria monocytogenes* (uzročnik trovanja hranom, listerioze), *Pseudomonas aeruginosa* (uzročnik kvarenja hrane, infekcija urinarnog trakta i rana), *Salmonella* spp. (uzročnik trovanja hranom, salmoneloze), *Shigella* spp. (uzročnik dijareje), *Staphylococcus aureus* (uzročnik trovanja hranom, infekcija rana), *Klebsiella pneumoniae* (uzročnik

infekcija rana i respiratornog trakta) i *Streptococcus pyogenes* (uzročnik infekcije ždrela) i dr. (Nedorostova i dr., 2009; Tajkarimi i dr., 2010; Ruiters i dr., 2016).

Neke od najpoznatijih patogenih mikrogljiva kod životinja i oveka su: dermatomicete, najčešće iz roda *Trichophyton* (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* i *T. tonsurans*) koje su uzročnici dermatomikoza (gljivičnih infekcija kose, kože i noktiju) (Soković i dr., 2013); vrste roda *Candida* koje uzrokuju kandidijaze (infekcije kože i sluzokože, pre svega vagine i usne duplje), pri čemu *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* i *C. glabrata* čine više od 80% kliničkih izolata usne duplje ljudi (Nikolić i dr., 2014); vrste roda *Aspergillus*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. glaucus*, koje su uzročnici aspergiloza (infekcija kože i sluzokože respiratornog trakta, oka, uha i dr.) (Pfaller i dr., 2003) i veoma su patogeni usled produkcije mikotoksina (Tajkarimi i dr., 2010).

**Antimikrobno dejstvo.** Intenzivnim istraživanjima se došlo do stvarnog „arsenala“ antimikrobnih agenasa koji deluju selektivno na rast patogena, ali se njihovom dužom upotrebom javlja problem rezistencije. Drugi ozbiljan problem vezan za upotrebu sintetičkih jedinjenja jesu neželjeni efekti, uključujući i kancerogenost, teratogenost, akutnu toksičnost i dug period razgradnje u prirodi (Soković i dr., 2013).

Komercijalni antibiotici su manje efikasni protiv Gram-negativnih bakterija u poređenju sa Gram-pozitivnim (Nikaido, 1996) što može biti objašnjeno razlikama u građini ćelijskog zida. Ćelijski zid Gram-negativnih bakterija je dvoslojan, kompleksnije strukturiran, sa dodatnom spoljašnjom membranom na površini sa uskim porinskim kanalima koja predstavlja barijeru za penetraciju kako lipofilnih, tako i hidrofilnih molekula (Nikaido, 1996, 2003). Hidrolitički enzimi (β-laktamaze) koji inaktiviraju antibiotike su kod Gram-pozitivnih bakterija ekstracelularni, dok su kod Gram-negativnih bakterija uglavnom periplazmatični što dodatno doprinosi njihovoj rezistenciji (Livermore, 1995; Nikaido, 1996, 2003). Rast mnogobrojnih manje senzitivnih ili patogena potpuno rezistentnih na komercijalne lekove je efikasno inhibiran jedinjenjima izolovanim iz biljaka (Tajkarimi i dr., 2010; Ruiters i dr., 2016). Stoga je od velikog interesa pronalaženje novih i

efikasnih komponenti sa antimikrobnim dejstvom koje se, kako brojne studije pokazuju, sintetišu u lekovitim i za inskim biljkama (Tajkarimi i dr., 2010).

Antimikrobno dejstvo etarskih ulja i ekstrakata lekovitih biljaka bogatih razli itim terpenima, fenolnim kiselinama, flavonoidima i taninima je iscrpno opisano u literaturi. Etarska ulja kao lipofilne smeše lako difunduju kroz elijsku membranu patogena, ošte uju njene proteine i lipide narušavaju i njenu strukturu i permeabilnost (Cowan, 1999; Bakkali i dr., 2008). U prisustvu etarskih ulja dolazi do morfofizioloških promena kod mikromiceta, kao što su izostajanje sporulacije, depigmentacija i aberantni razvoj konidiofora (Sokovi i dr., 2013).

**Antimikrobno dejstvo etarskih ulja i ekstrakata biljaka biljaka familije Lamiaceae.** Lekovite biljke familije Lamiaceae su prepoznate kao veoma potentni antimikrobni agensi protiv niza bakterija i mikromiceta (Bakkali i dr., 2008; Tajkarimi i dr., 2010; Sokovi i dr., 2013).

Procenjeno je da ulja ruzmarina, origana, žalfije, timijana i bosiljka inhibiraju 50 - 100% rasta bakterija (Tajkarimi i dr., 2010). Me u tri testirane vrste roda *Mentha*, najснаžnije antibakterijsko dejstvo ispoljilo je etarsko ulje *M. piperita*, naro ito na rast multirezistentnih sojeva *Shigella soneti* i *Micrococcus flavus*, dok je antifungalna aktivnost etarskih ulja svih vrsta bila ja a u odnosu na fungicid bifonazol (Mimica-Duki i dr., 2003). Etarsko ulja *Melissa officinalis* je je najaktivnije protiv testiranih Gram-pozitivnih bakterija i mikromiceta roda *Trichophyton* (Mimica-Duki i dr., 2004). Etarska ulja *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* i *Ocimum basilicum* pokazala su antimikrobno dejstvo protiv 13 bakterija i šest gljivica, pri emu se najefikasnijim pokazalo ulje origana koje je imalo dejstva i na multirezistentne sojeve *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* (Božin i dr., 2006). Etarska ulja *Satureja thymbra* i *Salvia fruticosa* iz Libije su pokazala antimikrobni efekat na sve testirane bakterije i mikromicete (Giweli i dr., 2012, 2013).

Tri vrste roda *Thymus*, a naro ito *Th. serpyllum* su ispoljile zna ajno antimikrobno dejstvo na oralne izolate bakterija i mikromiceta roda *Candida*, koje može biti pripisano prisustvu timola (Nikoli i dr., 2014). Glavne komponente etarskih ulja bosiljka (linalol, metilhavikol), origana i timijana (karvakrol, timol), ruzmarina (kamfor, 1,8-cineol, kamfor,



borneol), žalfije (tujon, 1,8-cineol, kamfor, borneol), kao i sinergisti ki efekti izme u tih komponenti doprinose snažnom antimikrobnom dejstvu etarskih ulja usnatica (Tajkarimi i dr., 2010). Metanolni ekstrakti *Salvia fruticosa*, *S. tomentosa* i *Origanum onites* su bili efikasniji protiv testiranih bakterija u pore enju sa drugim testiranim biljkama, što je objašnjeno visokim sadržajem ruzmarinske kiseline i karvakrola u njihovim ekstraktima (Askun i dr., 2009). Etanolni ekstrakti nekoliko vrsta iz familije Lamiaceae su ispoljili antibakterijsko dejstvo, posebno na rast *Staphylococcus aureus* (Generali -Mekini i dr., 2014). U istraživanju antimikrobne aktivnosti metanolnih i vodenih ekstrakata *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis* i *Salvia officinalis*, najснаžnije dejstvo su pokazali ekstrakti *S. officinalis* (Albayrak i dr., 2013). Etarska ulja i različiti ekstrakti stabla, listova i plodova tri vrste roda *Teucrium* iz Južnoafričke Republike, a posebno *T. africanum* efikasno su inhibirali rast nekoliko patogenih bakterija sa MIC između 0,25 - 8,00 mg/mL (Ruiters i dr., 2016).

### 1.2.3.3. Antikancerogena aktivnost biljaka familije Lamiaceae

**Kancerogeneza i kancer.** Kancerogeneza je višestepeni proces transformacije normalnih ćelija u ćelije kancera, koji nastaje usled pojačane ekspresije gena koji promoviraju ćeljski rast i proliferaciju i/ili smanjene ekspresije tumor-supresivnih gena (gena koji kontrolišu ćeljski rast) (Fantini i dr., 2015). Smatra se da je rizik pojave kancera u veoma malom procentu genetički determinisan i da uglavnom zavisi od niza drugih eksternih faktora (pušenje, nedostatak fizičke aktivnosti i nepravilna ishrana) što je slučaj sa etiologijom 75 - 85% hroničnih bolesti i oboljenja (Wahle i dr., 2010). U poslednjih par decenija je otkriven mehanizam kojim kontinuirani oksidativni stres vodi hroničnoj inflamaciji, koja može posredovati u nastanku velikog broja hroničnih bolesti uključujući i kancer (Reuter i dr., 2010; Wahle i dr., 2010; Sosa i dr., 2013). Incidenca kancera i mortalitet usled ovog oboljenja povećali su se za oko 22% do 1990. godine. Nakon toga, 2000. godine, zabeleženo je 10 miliona novih slučajeva i preko 6 miliona umrlih u svetu (Karaka i dr., 2012).

**Le enje kancera.** Smatra se da je 60% hemoterapeutika koji se danas koriste u klini kom le enju kancera izolovano iz nekog od prirodnih izvora (Stankovi i dr., 2011b), od ega ogroman procenat predstavljaju jedinjenja izolovana iz biljaka ili njihove sinteti ke derivate (Solowey i dr., 2014). Ve ina antikancerogenih lekova su sekundarni metaboliti, naj eš e alkaloidi, polifenoli, triterpeni ili steroidni glikozidi (Karaka i dr., 2012). Takvi primeri uklju uju taksol, vinblastin, vinkristin, kampotecin, topotekan, irinotekan, etoposid, rubomicin i kolhamin (Karaka i dr., 2012; Batra i Sharma, 2013).

Kancer-protektivne komponente su zastupljene u svakodnevnoj ishrani i uklju uju razli ite katehine (uglavnom iz zelenog, i u manjoj meri iz crnog aja), dialilsulfide i alicine iz crnog i belog luka, sulfarafane i indol-3-karbonole iz vrsta roda *Brassica*, genistein iz soje, delfinidin i elagi na kiselina iz zrelog vo a i razli itih orašastih plodova, kurkumin iz kurkume, rezveratrol iz crnog grož a i antocijane iz crvenog vo a i grož a (Wahle i dr., 2010). Veliki broj novijih *in vitro* i *in vivo* studija ukazuje su biljni polifenoli veoma mo ni antioksidansi, sposobni da moduliraju niz elijskih receptora i signalnih puteva koji suprimiraju kancerogenezu ime pomažu u prevenciji i suzbijanju kancera (Wahle i dr., 2010; Fantini i dr., 2015). Pojedina *in vivo* istraživanja su pokazala da je glavni nedostatak polifenola njihova slaba iskoristljivost, pa se veoma perspektivnim smatra kombinovani tretman koji uključuje više polifenola, kao i polifenole i komercijalne antikancerogene lekove (Fantini i dr., 2015). Lekovite biljke poseduju ogroman potencijal za otkrivanje novih i mo nih agenasa u prevenciji i le enju kancera (Balunas i Kinghorn, 2005).

**Antikancerogena aktivnost etarskih ulja i ekstrakata biljaka familije Lamiaceae.** Etarska ulja *Satureja thymbra*, *Sideritis perfoliata* i *Salvia officinalis* su ispoljila citotoksi ni efekat na elijske linije humanog melanoma (C32) i renalnog adenokarcinoma (ACHN) sa IC<sub>50</sub> vrednostima približno 100 - 400 µg/mL (Loizzo i dr., 2007). Etanolni ekstrakti *Salvia triloba*, *Origanum syriacum*, i u manjoj meri *O. vulgare* su pokazali snažnije citotoksi no dejstvo na MCF7 liniju kancera dojke u odnosu na vodene ekstrakte i etarska ulja (Al-Kalaldehy i dr., 2010). Metanolni ekstrakti nekoliko vrsta *Teucrium*, a posebno *T. chamedrys*, *T. montanum* i *T. arduinii*, su bili aktivni protiv elijske linije kancera kolona HCT-116 što je objašnjeno visokim sadržajem fenolnih komponenti

(Stanković i dr., 2011b). Özkan i Erdoğan (2011) su našli da je etarsko ulja *Origanum onites* slabiji citotoksični agens protiv HepG2 ćelije kancera (IC<sub>50</sub>: 149,12 µg/mL) u odnosu njegove glavne komponente karvakrol i timol (IC<sub>50</sub>: 53,09 µg/mL, odnosno 60,01 µg/mL). Ekstrakti ruzmarina i žalfije su redukovali vijabilnost RINm5F ćelija kancera pankreasa pacova kroz apoptozu i inhibiciju funkcije mitohondrija, a snažnije dejstvo ruzmarina je objašnjeno višim sadržajem karnozolne kiseline (Kontogianni i dr., 2013). Etarska ulja tri vrste roda *Thymus* su pokazale citotoksični efekat na četiri linije humanog kancera, uglavnom zahvaljujući timolu i karvakrolu, pri čemu nisu delovala toksično na matične ćelije jetre svinje na testiranim koncentracijama (Nikolić i dr., 2014).

#### 1.2.3.4. Antineurodegenerativno dejstvo biljaka porodice Lamiaceae

**Neurodegenerativna oboljenja.** Neurodegenerativnim oboljenjima se nazivaju stanja u kojima neuroni mozga i kičmene moždine propadaju što vodi gubitku mišićne koordinacije (ataksija) ili senzornoj i kognitivnoj disfunkciji (demencija) (Gill i Seitz, 2015). Smatra se da oksidativni stres igra važnu ulogu u patogenezi neurodegenerativnih bolesti kao što su Alchajmerova bolest (AD), Parkinsonova bolest (PD), amiotrofična lateralna skleroza (ALS) i dr. (Halliwell, 2001b).

Alchajmerova bolest (AD), koju je prvi put opisao 1906. godine bavarski neuropsihijatar Alois Alzheimer, je progresivna degeneracija koja najčešće pogađa stariju populaciju razvijenih zemalja (Perry i dr., 1996; Hostettmann i dr., 2006) sa prevalencom koja raste od 0,3% u 65 godina starosti do gotovo 50% nakon 85-te godine (Akhondzadeh i dr., 2003). Prepoznaje se po gubitku kratkotrajne memorije, dezorijentaciji, slabom rasuđivanju, promenama u raspoloženju i/ili ponašanju (Perry i dr., 1996; Akhondzadeh i dr., 2003; Topcu i Kusman, 2014). Morfološki se karakteriše pojavom strukturnih abnormalnosti, kakve su D-amiloidne naslage i neurofibrilarne petlje od hiperfosforilisanog  $\tau$ -proteina (Perry i dr., 1996; Adewusi i dr., 2010), a neurohemijski gubitkom aktivnosti holinergičkih neurotransmitera, acetilholina (ACh) i butirilholina (BuCh) u cerebralnom korteksu (Orhan i dr., 2007, 2012).

Parkinsonova bolest (PD), nazvana po naučniku Džejmusu Parkinsonu, je neurodegenerativna bolest koja pogađa približno 1% svetske populacije iznad 60 godina i karakteriše se degeneracijom dopaminergičkih neurona i prestankom sinteze dopamina u *substantia nigra* srednjeg mozga što dalje prouzrokuje različite motoričke poremećaje kao što su tremor u stanju mirovanja, bradikinezija, rigidnost i poremećaji ravnoteže (Gelb i dr., 1999; Nussbaum i Ellis, 2003). U patogenezi PD ključnu ulogu igraju veoma reaktivni dopaminski kvinonski derivati koji se vezuju za biomolekule u dopaminergičkim neuronima i oštećuju ih. Dopamin se u normalnim uslovima delimično prevodi u neuromelanin u reakciji katalizovanoj tirozinazom, ali u patološkim uslovima dolazi do hiperaktivnosti tirozinaze i hiperprodukcije dopamina i neuromelanina, što vodi ka ćelijskoj smrti ovih neurona i prestanku sinteze dopamina (Khan i dr., 2007; Hasegawa, 2010). Patološke karakteristike uključuju prisustvo depozicija specifičnih proteina  $\alpha$ -sinukleina u citoplazmi neurona (Levijeva telašca) u oštećenim i u vidu konastih proteinskih inkluzija između neurita (Levijevi neuriti) (Nussbaum i Ellis, 2003), kao i demelanizaciju ovih neurona u kasnijim stadijumima bolesti (Hasegawa, 2010).

Multifunkcionalni enzim sa bakrom u aktivnom centru, tirozinaza (TYR), katalizuje oksidaciju monofenola, *o*-difenola i *o*-kvina (Khan i dr., 2006; Wang i dr., 2006) i široko je rasprostranjen kod biljaka, životinja i mikroorganizama (Kim i Uyama, 2005; Masuda i dr., 2005). Tirozinaza je uključena u proces enzimske oksidacije biljnih fenola koji rezultuje pojavom nepoželjne braon boje hrane biljnog porekla (Kim i Uyama, 2005; Masuda i dr., 2005; Loizzo i dr., 2012). Ovaj enzim ima ključnu ulogu u sintezi melanina u melanocitima životinja (Kim i Uyama, 2005; Wang i dr., 2006; Hasegawa, 2010), pa se smatra odgovornom za pojavu hiperpigmentacije kože (melazme, staračke pege, itd).

**Terapija AD i PD.** U terapiji AD se koriste lekovi koji kompenzuju deficit ACh, uključuju i ACh prekursore, antagoniste muskarinskih i nikotinskih receptora i AChE inhibitore (Akhondzadeh i dr., 2003). Inhibicija AChE, enzima odgovornog za hidrolizu ACh do acetilkoenzima A i holina, je najšire korišćeni model lečenja AD (Perry i dr., 1996; Akhondzadeh i dr., 2003; Orhan i dr., 2007). Neki od prirodnih i sintetičkih lekova, kao što su donepezil (Aricept), rivastigmin (Exelon), galantamin (Razadyne, Reminyl) i takrin

(Cognex) su odobreni od Agencije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration*, FDA) za tretmane slu ajeva blage do umerene AD (Perry i dr., 1996; Topcu i Kusman, 2014). Rezultati pojedinih studija ukazuju na nedostatke nekih od pomenutih inhibitora (kratak period dejstva, nizak stepen iskoristljivosti, pojava anoreksije, dijareje, mu nine, gr eva, poreme aja spavanja) (Chattipakorn i dr., 2007).

Mnogobrojne biljke iz razli itih familija (*Amaryllidaceae*, *Fumariaceae*, *Papaveraceae* i *Lamiaceae*) su istražene u cilju pronalaženja novih i efikasnih inhibitora AChE. Neki od triterpenoida, kao što su oleinska i ursolna kiselina, ginsenoidi, ginkgolidi, kanabinoidi, kao i neke alkaloidne biljke su se pokazale kao mo ni potencijalni inhibitori AChE, ali su još uvek u fazi klini kog testiranja (Topcu i Kusman, 2014). Sem toga, antioksidansi mogu redukovati oksidativni stres i tako smanjiti ošte enja DNK, odumiranje nervnih elija i agregaciju amiloidnih naslaga u tkivu mozga (Demirezer i dr., 2014).

Do sada je opisan veliki broj prirodnih i sinteti kih TYR inhibitora, od kojih je najintenzivnije prou avana koji na kiselina (Kim i Uyama, 2005; Chang, 2009; Loizzo i dr., 2012; Karina i dr., 2013). Ovaj metabolit, izolovan iz gljiva rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, inhibira monofenolaznu aktivnost tako što nagra uje helate sa jonom bakra u aktivnom centru enzima, pa se primenjuje kao agens za izbeljivanje kože i aditiv koji spre ava potamnivanje namirnica (Chang, 2009; Karina i dr., 2013). Inhibitori TYR imaju široku primenu kako u prehrambenoj industriji, tako i u le enju hiperpigmentacije i terapiji odre enih oblika melanoma (Kim i Uyama, 2005; Masuda i dr., 2005; Wang i dr., 2006; Khan i dr., 2007; Loizzo i dr., 2012). Iz razli itih lekovitih biljaka izolovan je niz efikasnih inhibitora TYR: anisaldehyd, kvercetin, miricetin i njegovi glikozidi, i najskorije, dalenin (Jennifer i dr., 2012; Karina i dr., 2013; Aminudin i dr., 2015).

**Antineurodegenerativna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata biljaka familije *Lamiaceae*.** Neki rodovi ove familije, posebno *Salvia*, *Rosmarinus*, *Melissa* i *Teucrium*, su dobro poznati po svom neuroprotektivnom dejstvu (Topcu i Kusman, 2014). Testiraju i potencijal etarskih ulja, etanolnih i vodenih ekstrakata deset biljaka iz Portugala u inhibiciji AChE, Ferreira i dr. (2006) su kao najaktivnije biljke istakli *Melissa officinalis*, *Mentha suaveolens* i *Lavandula pedunculata*. Orhan i dr. (2008) su pokazali visok stepen inhibicije

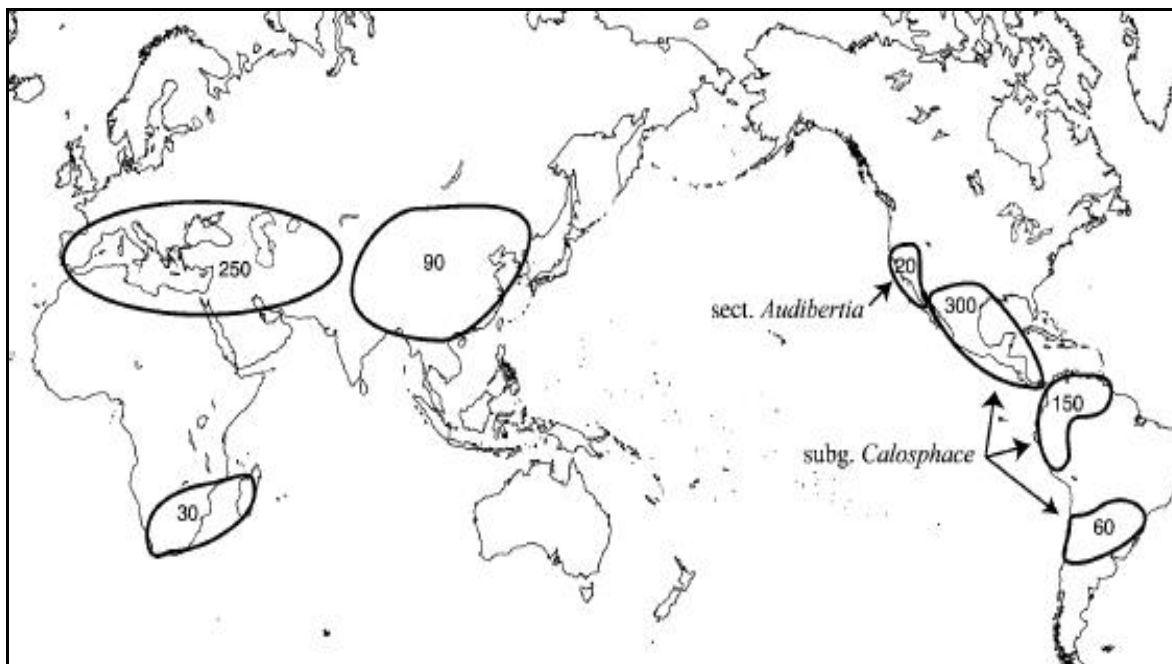
AChE i BuChE etarskim uljima vrsta *Origanum*, *Mentha* i *Satureja*, dok su vrste rodova *Lavandula*, *Salvia* i *Ocimum* ispoljile umerenu do blagu inhibiciju AChE pri emu su ulja svih vrsta bila aktivnija u odnosu na izolovane glavne komponente. Etanolni ekstrakti *Teucrium polium* i *Salvia triloba* su efikasno inhibirali AChE (IC<sub>50</sub>: 0,55 mg/mL, odnosno 0,71 mg/mL) i pokazali antianamneziono dejstvo, dok je ekstrakt *Melissa officinalis* bio gotovo u potpunosti inaktivan (Orhan i Arslan, 2009).

Vladimir-Knežević i dr. (2014) su saopštili preko 75% inhibicije AChE za ekstrakte nekoliko vrsta, uključujući *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, *Satureja montana*, *Teucrium chamaedrys*, *Thymus vulgaris* i dr. Lin i dr. (2011) su našli da su vrste roda *Ocimum*, *Origanum majorana* i *Rosmarinus officinalis* sa procentima inhibicije TYR između 20 i 50% značajno efikasnije u odnosu na vrste rodova *Mentha*, *Salvia* i *Lavandula*. IC<sub>50</sub> vrednosti tri vrste *Mentha* su bile 5 - 10 puta više u odnosu na kojine kiselinu (Fatiha i dr., 2015). Među nekoliko testiranih taksona porodice Lamiaceae, značajnu inhibiciju TYR su ispoljili samo ekstrakti *O. majorana* i tri vrste *Lavandula* (Lee i dr., 2011a), dok su *Salvia*, *Ocimum*, *Rosmarinus* i drugi bili potpuno inaktivni (IC<sub>50</sub>>1 mg/mL). Biljke porodice Lamiaceae bogate ruzmarinskom kiselinom (*Rosmarinus*, *Salvia*, *Melissa*, *Nepeta*, *Lavandula*), etarskim uljem sa timolom i karvakrolom (*Satureja*, *Thymus*, *Origanum*), triterpenima (ursolna, oleinska i betulinska kiselina) i abitetanskim diterpenima kao što su karnozol i karnozolna kiselina (*Rosmarinus*, *Salvia*) mogu biti značajne u tretmanu neurodegenerativnih poremećaja, naročito AD (Topcu i Kusman, 2014).

### 1.3. Rod *Salvia* L.

Vrste roda *Salvia* (žalfija) su vekovima poznate po svojim lekovitim svojstvima, pa je i samo ime roda izvedeno iz latinske reči *salvare* (spasiti, sauvati) (Dweck, 2000; Barišević i Bartol, 2000). Rod *Salvia* pripada podfamiliji Nepetoideae, tribusu Menthae i subtribusu Salvinae (Harley i dr., 2004; Moon i dr., 2008a,b). *Salvia* je kosmopolitski rod sa najvećim brojem vrsta u okviru porodice Lamiaceae. Prema Walker i dr. (2004), rod *Salvia* obuhvata blizu 1.000 vrsta, sa tri glavna centra diverziteta u regionima Starog i

Novog sveta: Centralna i Južna Amerika (500 spp.), Centralna Azija i Mediteran (250 spp.), Isto na Azija (90 spp.) (Slika 3).



**Slika 3.** Centri diverziteta roda *Salvia*. Približan broj vrsta za svaki region dat je unutar svake oblasti (Walker i dr., 2004).

Vrste ovog roda su različito klasifikovane od strane različitih autora. Prvu klasifikaciju je izvršio George Bentham 1848. godine, kada je u rodu sa 291 do tada opisanom vrstom izdvojio 12 sekcija na osnovu morfologije ašice, krunice i prašnika. Nešto kasnije (1876. godine) je modifikovao svoju klasifikaciju i ime je rod *Salvia* podelio na 4 podroda u koje je grupisao sledeće sekcije:

- ✂ podrod *Salvia* obuhvata vrste Starog sveta - imaju krunicu sa anulusom; dve zadnje teke antere su sterolne, rudimentarne (sekcije: Hymenosphace, Eusphace, Drymosphace);
- ✂ podrod *Sclarea* obuhvata vrste Starog sveta - krunica bez anulusa; dve zadnje teke antere su sterilne i formiraju glutinatorijum (sekcije: Horminum, Aethiopsis, Plethiosphace);

- ✂ podrod *Calosphace* obuhvata vrste Novog sveta - krunica sa anulusom; dve zadnje teke su sterilne, razvijene istovremeno i formiraju glutinatorijum (samo sekcija Calophace);
- ✂ podrod *Leonia* obuhvata vrste Starog i Novog sveta koje imaju krunicu sa anulusom; dve zadnje teke antere su sterilne i odvojene (sekcije: Echinospface, Pycnospface, Heterospface, Notiospface, Hemispface) (Walker i dr., 2004).

Kasnije, otkri em novih vrsta, Bentham-ova klasifikacija je modifikovana, ali postoje pojedini botani ari koji je i danas odbacuju. Walker i dr. (2004) su prou avali veze izme u roda *Salvia* i drugih lanova tribusa Menthae koriste i regione hloroplasne DNK (rbcL i trnL-F), na osnovu ega su došli do važnog zaklju ka da rod *Salvia* nije monofiletski.

Ovaj rod je u flori Evrope zastupljen sa 36 vrsta koje su klasifikovane u 7 sekcija: *Salvia* (Eusphace Bentham) (11 spp.), *Hymenosphace* (1 spp.), *Aethiopsis* (5 spp.), *Drymosphace* (2 spp.), *Plethiosphace* (14 spp.), *Horminum* (1 spp.) i *Hemispface* (2 spp.) (Hedge, 1972). U flori Srbije je zastupljeno 14 vrsta ovog roda, uklju uju i jednogodišnje (npr. *S. viridis*), dvogodišnje (*S. sclarea*, *S. aethiopsis*) i najve im delom višegodišnje (npr. *S. officinalis*, *S. verticillata*, *S. nemorosa*, *S. pratensis*, i dr.) zeljaste biljke, polužbunove i žbunove (Dikli , 1974). Ve ina vrsta raste na dobro osun anim i toplim staništima, na kamenitim padinama ili pored puteva i na suvim travnatim ili kultivisanim površinama (Hedge, 1972).

### 1.3.1. Morfološke, anatomske i mikromorfološke karakteristike vrsta roda *Salvia*

**Koren.** Korenov sistem vrsta roda *Salvia* je osovinski, sa glavnim korenom dužine od 10 do preko 70 cm koji je spolja je pokriven neravnom, tamno-braon grubom korom. Plan anatomske gra a korena je prili no uniforman kod razli itih vrsta (Özdemir i Senel, 1999; Kandemir, 2003; Baran i Özdemir, 2006; Özkan i dr., 2008; Özdemir i dr., 2009; Dereboylu i dr., 2010; Kahraman i dr., 2010a,b; Kahraman i Dogan, 2010; Shirsat i dr.,



2012; Çelep i dr., 2014). Na površini poprečnog preseka je periderm, sačinjen od nekoliko slojeva elija nepravilnog oblika. Kora je predstavljena malim brojem slojeva parenhimskih elija. U okviru sekundarnog floema se uočavaju grupice sklerenhimskih vlakana. Kambijum se uglavnom teže uočava; u nekim slučajevima se vidi kao 1 - 2 sloja elija. Sekundarni ksilem je dobro razvijen, izgrađen od traheja i traheida. Kod starijih korenova, u centru se nalazi srž izgrađena od varijabilnog broja slojeva parenhimskih elija, kao i ostaci primarnog ksilema (Kandemir, 2003; Baran i dr., 2008; Özdemir i dr., 2009).

**Stablo.** Stablo je uglavnom uspravno, visine od 20 - 100 (nekad i do 120 cm), neregularno, slabo ili veoma razgranato i to uglavnom u gornjem delu. Višegodišnje vrste obrazuju rizom koji je debeo, kos ili horizontalan (Dikli, 1974). Stablo je na poprečnom preseku tipično četvorouglasto ili ređe okruglo (Dikli, 1974). Mnogi istraživači su došli do zaključka da je opšti plan primarne grane stabla sličan kod različitih vrsta (Özdemir i dr., 1999; Kandemir, 2003; Baran i Özdemir, 2006; Özkan i Soy, 2007; Özkan i dr., 2008; Akta i dr., 2009; Koyuncu i dr., 2009; Kahraman i dr., 2009; Özdemir i dr., 2009; Baran i dr., 2010; Kahraman i dr., 2010a,b; Kahraman i Dogan, 2010; Shirsat i dr., 2012; Çelep i dr., 2014). Na površini stabla se nalazi epidermis izgrađen od jednog sloja elija pravougaonog ili okruglog oblika, pokriven tankom i glatkom kutikulom, sa mnogobrojnim glandularnim i neglandularnim trihomama. Subepidermalno u uglovima stabla je uočljiv višeslojni kolenhim koji zajedno sa 3 - 6 slojeva parenhimskih elija čini primarnu koru.

Provodni cilindar započinje prstenom sklerenhimskog tkiva; često ne postoji odvojen sklerenhimski prsten, već samo negrupisana sklerenhimska vlakna prisutna uz elemente floema (Baran i dr., 2008). Provodni elementi su predstavljeni užim prstenom floema i širim prstenom ksilema, dok je kambijum najčešće teško uočljiv. U samom centru stabla je srž sastavljena od krupnih parenhimskih elija sa mnoštvom intercelulara. Sekundarna grana višegodišnjeg izdanka (rizoma) se znatno razlikuje u odnosu na primarnu; ispod raskinutog epidermisa nalazi se periderm sastavljen od 1 - 3 sloja elija heksagonalnog oblika. Primarna kora je tanja i potisnuta ka periferiji, dok se ispod nje formiraju elementi sekundarne grane. Sržni zraci su sačinjeni od 2 - 12 nizova elija i veoma varijabilni u strukturi (Kandemir, 2003). Vrste koje preferiraju sušna staništa imaju

donekle modifikovan opšti plan grane stabla u cilju što boljeg prilagođavanja uslovima sredine. Kahraman i dr. (2009) su uočili da kserofita *S. staminea* poseduje deblju i naboranu kutikulu, kao i veći broj slojeva korteksa u porećenju sa mezofitnom vrstom *S. glutinosa*.

**Listovi.** Listovi su jajasti, srcasti ili kopljasti, nedeljeni ili perasto deljeni. Po obodu su nenazubljeni ili grubo testerasto nazubljeni, sa gustom mrežastom nervaturom. Prizemni listovi su veoma često skupljeni u rozetu smeštenu u osnovi stabla. Brakteje su uglavnom jasno diferencirane i jajastog oblika, više-manje različito obojene (Diklić, 1974). Plan grane listova različitih vrsta *Salvia* na poprečnom preseku je donekle sličan (Baran i dr., 2008; Özkan i dr., 2008; Kahraman i dr., 2009, 2010a,b; Kahraman i Dogan, 2010; Shirsat i dr., 2012; Çelep i dr., 2014).

Listovi *Salvia* su uglavnom bifacijalni; epidermis lica je pokriven debljim slojem kutikule i grane od krupnijih ćelija u odnosu na epidermis nalik. Mezofil je diferenciran na palisadno tkivo orijentisano ka adaksijalnoj strani (krupne, izdužene i gusto složene ćelije bogate hloroplastima, 2 - 3 sloja) i sunčerasto tkivo ka abaksijalnoj strani (izodijametrisne ćelije sa mnoštvom intercelulara i sa hloroplastima, 3 - 4 sloja). Ponekad, specijalno kod vrsta otvorenih i sušnih staništa, sa abaksijane strane postoji dodatni sloj palisadnog tkiva kao odgovor na intenzivnu insolaciju (Kahraman i Dogan, 2010). Središnji nerv je okružen kolenhimskom sarom što je karakteristika celog roda (Kahraman i dr., 2009). Kao i cela familija Lamiaceae, vrste roda *Salvia* imaju amfi- i hipostomatične listove, pri čemu su stome najčešće diacitnog tipa (Baran i dr., 2008; Kahraman i dr., 2009, 2010a,b). Struktura, raspored, oblik i broj provodnih snopova u lisnoj dršci i distribucija sklerenhimskih vlakana oko floema i/ili ksilema može imati značaj u taksonomiji roda *Salvia* (Kahraman i dr., 2009; Akçin i dr., 2011).

**Mikromorfološke karakteristike roda *Salvia*.** Mikromorfološki karakteri (trihome, skulpturiranost egzine polena i ornamentacija površine merikarpa) variraju u širokom opsegu između vrsta, pa mogu imati značaj u taksonomskim izučavanjima na infrageneričkom nivou.

Indumentum listova, u čiji sastav ulaze trihome, obezbeđuje površinsku zaštitu od isušivanja, dok sekundarni metaboliti sintetisani u glandularnim trihomama imaju širok spektar bioloških uloga (Bakkali i dr., 2008). Vrste roda *Salvia* poseduju neglandularne (mehaničke) i glandularne (žlezdane) trihome na svojim vegetativnim i reproduktivnim organima. Mikromorfološki karakteri indumentuma *Salvia* (strukturni tipovi, distribucija, broj i gustina trihoma) variraju između vrsta, populacija, jedinki i biljnih organa iste jedinke (Corsi i Bottega, 1999; Özdemir i Senel, 1999; Krstić i dr., 2006; Baran i dr., 2008).

Istraživači su opisali veliki broj tipova neglandularnih trihoma kod ovog roda i utvrdili da one variraju u obliku, dužini (kratke/dugačke), broju ćelija (jedno- ili više ćelijske), broju nizova ćelija (uni- i multiserijalne), površini (glatke/papilozne) (Krstić i dr., 2006; Çelep i dr., 2014). Nasuprot tome, glandularne trihome su bile prisutne u dve osnovne forme: peltatne (štitaste) i kapitatne (glavičaste) trihome koje se međusobno razlikuju u strukturi i načinima sekrecije (Fahn, 1988; Kaya i dr., 2007).

Peltatne trihome vrsta roda *Salvia* se razlikuju u broju ćelija sekretorne glavice pri čemu je taj broj uglavnom species-specifičan i može poslužiti kao taksonomski marker na infragenetičkom nivou, a kreće se od 4 - 12 kod različitih vrsta (Corsi i Bottega, 1999; Özdemir i Senel, 1999; Krstić i dr., 2006). U nekim slučajevima su sekretorne ćelije raspoređene u dva kruga, centralnom i perifernom, kao kod *S. sclarea* (Özdemir i Senel, 1999), *S. argentea* (Baran i dr., 2008), *S. quezelii* (Çelep i dr., 2014), *S. aegyptiaca* (Janošević i dr., 2016) i dr.

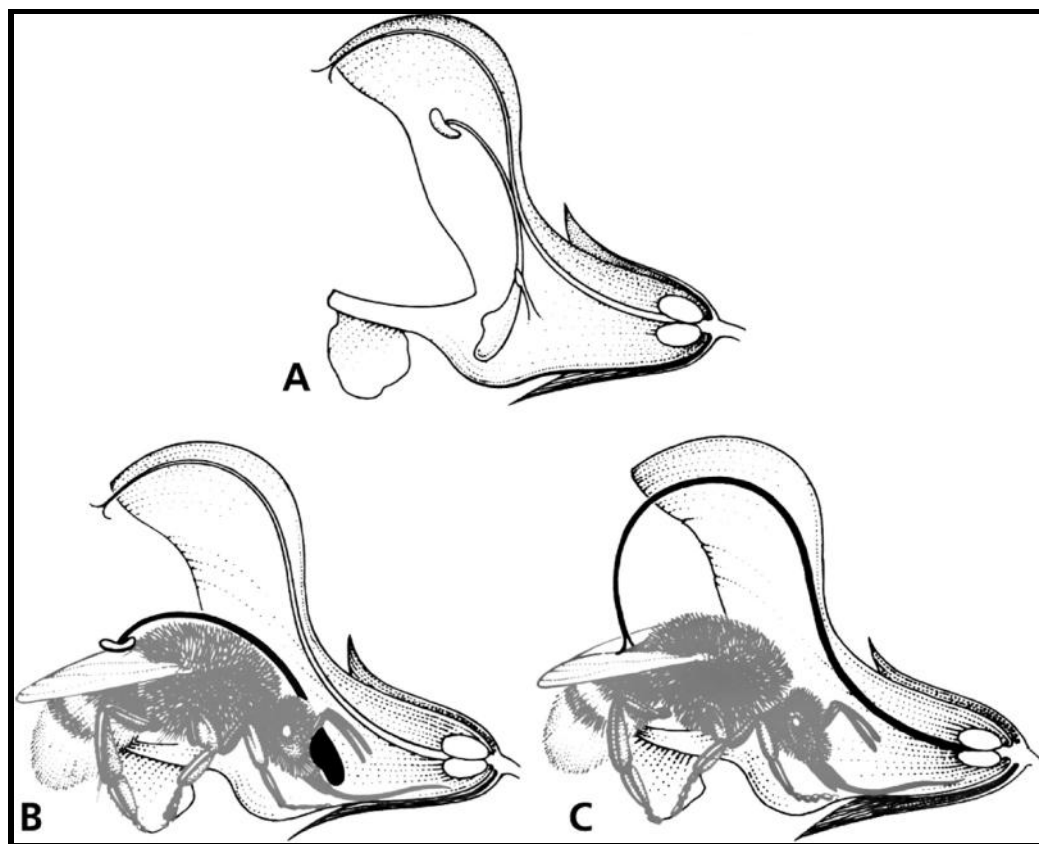
Kapitane trihome imaju nešto veći diverzitet u odnosu na glandularne, pri čemu se najčešće izdvajaju „niske“ i „visoke“ kapitane trihome sa kratkom, odnosno dugačkom drškicom. Corsi i Bottega (1999) izdvajaju 4 tipa kapitatnih trihoma kod *S. officinalis* po broju i veličini ćelija glavice (1 - 2), broju i dužini ćelija drške (1, 2 ili više), prisustvu vratne ćelije kao i distribuciji na biljnim organima. Različiti autori klasifikuju kapitatne trihome na različite načine, pa je veliki broj različitih strukturnih tipova i podtipova identifikovan kod vrsta roda *Salvia*, uključujući i *S. verticillata* (Krstić i dr., 2006), *S. argentea* (Baran i dr., 2008), *S. cadmica* (Özkan i dr., 2008), *S. sclarea* (Özdemir i Senel,

1999), *S. pleibeia* (Shirsat i dr., 2012), *S. fruticosa* (Al Sheef i dr., 2013) *S. quezelii* (Çelep i dr., 2014), *S. aegyptiaca* (Janošević i dr., 2016) i dr.

**Cvet.** Cvet je dvousnat, specifično građen iz gornje i donje usne; ašica je zvonasta ili cevasta, dvousnata; krunica je dvousnata, gornja usna krunice je uspravna i uglavnom izrazito ispupčena, cela ili na vrhu usna, a donja usna je proširena i trorežnjevita, sa srednjim režnjem izrazito većim od bočnih (Dikli, 1974). Cvet je po pravilu je zigomorfan, sa retkim izuzecima (kakva je pojava pelorije kod *S. pratensis* gde su svi cvetovi u cvasti zigomorfni sem terminalnog koji je aktinomorfan) (Petković i dr., 2005). Cvetovi su sa veoma dobro razvijenom drškom, često veoma veliki i upadljivi i najčešće složeni u prividne pršljenove koji zajedno čine proste ili razgranate, guste ili proređene prividne cvasti (grozdove ili klasove) (Dikli, 1974). Boja krunice varira od bele (*S. austriaca*, *S. aurita*, *S. balisiana*) preko žute (*S. glutinosa*, *S. omeiana*, *Salvia greggii*) do plave (*S. guaranitica*, *S. bogotensis*, *S. forreri*), ružičaste (*S. buchmananii*, *S. evansiana*), crvene (*S. splendens*, *S. pubescens*) i ljubičaste (*S. africana*, *S. amplexicaulis*, *S. ringens*). Brakteje su razvijene, ponekad i brakteole, i često veoma živo obojene, kao npr. kod *S. viridis* koja se gaji kao ukrasna biljka.

Cvetovi su specijalizovani u vezi sa specifičnim načinom oprašivanja pomoću insekata, što su najčešće bumbari i pčele. Imaju dva fertilna prašnika što je izuzetak u porodici Lamiaceae koju karakteriše prisustvo najčešće 4 prašnika. Unutrašnji prašnici se razvijaju kao staminodije ili se ne razvijaju. Gornja usna krunice je razrasla i ispupčena tako da štiti prašnike i tučak, a donja služi kao pista za sletanje insekata. Filamentum je veoma skrtačeno i zadebljao i povezan sa konektivom pokretnim zglobovom. Konektiv je uzdužno podeljen na dva kraka; donji krak - veoma zadebljao, kašikasto povijen i bez poluantere i gornji - duži deo sa jednom poluanterom. Pošto su nektarije u dubini cveta, insekt traže i nektar gura kraj i deo konektiva koji preko zgloba obara poluanteru, pa se polen istresa na dorzalni deo toraksa i abdomena insekta koji ga nosi na drugi cvet (mehanizam poluge) (Slika 4). Prvo sazrevaju prašnici, a tek onda tučak (protandrija) što je mehanizam koji sprečava samooprašivanje (Walker i dr., 2004).

Postoje studije iji rezultati pružaju jasne dokaze o polifiletskom poreklu *Salvia* iz razli itih linija koje poseduju dva fertilna prašnika i prašni ki mehanizam poluge (Walker i dr., 2004; Walker i Sytsma, 2007). Wester i Claben-Bockhoff (2006) izdvajaju posebnu grupu ornitofilnih *Salvia* u Južnoj Africi sa specijalizovanim morfološkim karakteristikama cveta u vezi sa oprašivanjem kolibrima.



**Slika 4.** Mehanizam polinacije kod *Salvia pratensis*. **A)** cvet sa neaktiviranim mehanizmom poluge. Kada pollinator u e u cvet (**B**), polen se mehanizmom poluge istresa iz poluantera na njegov dorzalni deo. Kada pollinator u e u stariji cvet, u kom su prašnici resorbovani, nakupljeni polen se sa njegovih le a prenosi na žig tu ka (**C**) (Walker i dr., 2004).

Sem upadljive boje, mirisa i dvousnate forme cvetova, izuzetno važan atraktant za oprašiva e jeste nektar koji ove vrste produkuju. Nektarije su kod *S. officinalis* smeštene u donjem delu krune cevi, i traže i ga insekt nesvesno biva primoran na “saradnju“

zahvaljuju i “savršenom“ mehanizmu poluge. Kod roda *Salvia* su najčešće prisutne floralne nektarije i to u obliku toralnog, ispupčenog prstena u bazi ovarijuma, gde se sintetisani nektar izljuje preko modifikovanih stomata u epidermisu (Maukovići-Jocić, 2010). U nektaru nekih vrsta dominiraju heksoze (*S. judaica*), a kod nekih drugih sahara (*S. fruticosa*) (Dafni i dr., 1988).

Na poprečnom preseku listi i vrsta roda *Salvia* uočljiva su dva sloja epidermisa između kojih je smešteno parenhimsko tkivo bogato hloroplastima sa mnoštvom intercelulara. Na poprečnom preseku kruničnog listi može se uočiti epidermis lica sa tankom kutikulom, ali bez papila. Slično tome, ispod epidermisa se nalazi nekoliko slojeva parenhima u kome su smešteni mnogobrojni provodni snopci (Özdemir i dr., 2009; Shirsat i dr., 2012).

**Polen.** Osnovni parametri koji se uzimaju u obzir u palinološkim istraživanjima jesu oblik polenovog zrna, dužina polarne i ekvatorijalne ose, kao i njihov odnos, broj, dužina i širina kolpi, debljina egzine i intine, kao i obrazac skulpturiranosti egzine polenovog zrna. Polen je u subtribusima Menthinae i Salviinae (tribus Mentheae, subfamilija Nepetoideae) uglavnom heksakolpatni što je ocenjeno sinapomorfnim karakterom kod Nepetoideae (Moon i dr., 2008a,b).

Polenova zrna vrsta roda *Salvia* su pojedinačna (monade), a osnovni oblici prisutni kod predstavnika ovog roda iz Turske su suboblatni, oblatno-sferični i prolato-sferični. Polenova zrna su heksakolpatna, sa izuzetkom *S. recognita* iz sekcije *Salvia* sa oktakolpatnim polenovim zrnima. Postoje tri glavna obrasca skulpturiranosti; uobičajeni je retikulatno-perforatni, zatim retikulatno-granulatni i biretikulatni tip (Özler i dr., 2011). Kahraman i dr. (2010b) su proučavali palinološke karakteristike vrste *S. chrysophylla* i uočili da ova vrsta poseduje heksakolpatna, radijalno simetrična i izopolarna polenova zrna uobičajena u familiji Lamiaceae. Polenova zrna su najčešće loptastog oblika i spljoštena na polovima. Ornamentacija egzine je biretikulo-poratna, kao i kod većine drugih vrsta roda *Salvia*. Do sličnih rezultata su došli Kahraman i Dogan (2010) analizirajući *S. limbata* i *S. palaestina* i Çelep i dr. (2014) na *S. quezelii*.

**Plod.** Vrste roda *Salvia* poseduju merikarpium, plod specifičan za familiju Lamiaceae, koji je istovremeno i njihovo seme (Marin, 1996). Plodi i vrsta roda *Salvia* su glatki, jajasto - trouglasti do četvorouglasti (Dikli, 1974). Kod *S. officinalis* su rebra na mestu spoja orašica u merikarpu u potpunosti nestala, pa orašice imaju kružan oblik. Vrste roda *Salvia* imaju stopalni ožiljak u bazi trbušne strane orašice; okrugao je, udubljen, utisnut i nije naročito upadljiv (Marin, 1996).

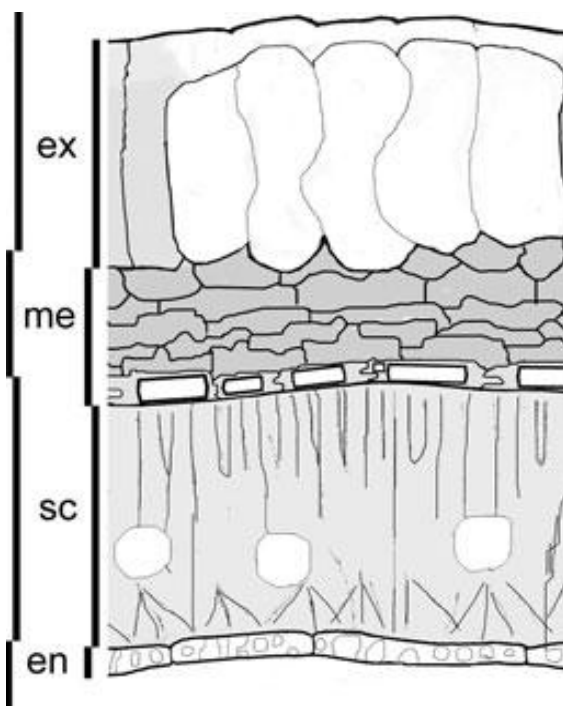
Duleti -Laušević i Marin (1999) i Büyükkartal i dr. (2011) ističu da je debljina perikarpa često povezana sa veličinom merikarpa u podfamiliji Nepetoideae. Interesantno je da je kombinacija karaktera merikarpa (oblik i površinska ornamentacija orašica) očigledno korelisana sa tipom prašnika za svaki takson u okviru *Salvia*. Ova korelacija je podržana molekularnim filogenetskim dokazima (Walker i Sytsma, 2007).

Ryding (2010) deli perikarp *Menthae* na četiri glavna regiona (Slika 5). Egzokarp se sastoji iz krupnih, tankozidnih ćelija koje osluznjavaju nakon kvašenja, između kojih se nalaze sitnije debelozidne ćelije braonkaste boje koje ne osluznjavaju. Mezokarp je uglavnom višeslojan i debeo, građan najčešće od parenhimskih, nekad i sklerenhimskih ćelija. Poslednji sloj mezokarpa je deblji, ćelije i sadrži prizmatične kristale za razliku od ostalih. Sklerenhimski region je jednoslojan i sastavljen od vertikalno porećanih „koštanih ćelija“ (makrosklereida) koji akumuliraju tanine. Ovaj sloj ima približnu debljinu kao polovina perikarpa. Unutrašnji epidermis perikarpa, endokarp, je jednoslojan i debeo.

Miksokarpija je pojava produkcije sluzi kada merikarp (preciznije egzokarp) dođe u kontakt sa vlažnom podlogom. Sluz igra veoma važnu ulogu u prihvatanju merikarpa za zemljište, pa je Hedge (1970) uočio da je kod biljaka suvljih staništa miksokarpija znatno češća. Morfologija merikarpa, debljina perikarpa i proporcija njegovih individualnih slojeva mogu biti korisne u sistematici roda *Salvia*, pa Hedge (1970) grupiše vrste koje proizvode sluz u 4 grupe u odnosu na boju (bela/smeđa) i transparentnost sluzi (prozirna/neprozirna). Kod *S. huberi* i *S. rosifolia* sluz se formira prvih pola sata nakon vlaženja, a kod *S. hedgeana* tek nakon sat, pri čemu se mogu razlikovati dva tipa sluzi: transparentna sa malo fibrila ili neprozirno mlečno bela sa fibrilima i sa zracima formiranim od sluzi (Büyükkartal i dr., 2011). Literaturni podaci pokazuju da je produkcija

sluzi u familiji Lamiaceae prisutna samo u podfamiliji Nepetoideae i to naročito kod nekih vrsta kakva je *S. hispanica* (chia) (Capitani i dr., 2013).

Özkan i dr. (2009) grupiše 12 vrsta *Salvia* iz različitih sekcija na osnovu karakteristika merikarpa na one sa retikularnim (sa mrežastom površinom), foveatnim (sa jamicama) i verukatnim merikarpom (sa nepravilno izobličanom površinom). Vrste iz sekcije *Aethiopsis* imaju sva tri tipa skulptiranosti merikarpa; vrste iz sekcija *Salvia* i *Hymenosphace* imaju foveatni, a iz sekcija *Hemisphace* i *Plethiosphace* imaju verukatni obrazac skulptiranosti merikarpa (Özkan i dr., 2009), dok Kahraman i dr. (2011) ističu da je u sekciji *Hymenosphace* najviše vrsta sa merikarpima kolikulatnog (brežuljkastog) tipa; nešto ređi obrasci su retikulatni, verukatni i foveatni.



**Slika 5.** Šema preseka perikarpa *Salvia coccinea* (en - endokarp, ex - egzokarp, me - mezokarp, sc - sklerenhim) (Ryding, 2010).



### 1.3.2. Lekovite karakteristike i upotreba vrsta roda *Salvia*

Narodni naziv, žalfija, se odnosi na vrstu *S. officinalis*, koja je ofinicalna u farmakopejama mnogih zemalja (Dweck, 2000; Bari evi i Bartol, 2000). Ova biljka je koriš ena u drevnom Egiptu da bi se poboljšala plodnost kod žena. Gr ki filozof Teofrast je razlikovao dve vrste žalfija - *sphakos* (divlja) i *elelisphakos* (kultivisana), od kojih je drugopomenuta kasnije nazvana *Salvia* od strane Rimljana (lat. *salvare* - sa uvati) (Dweck, 2000) mada se ovaj naziv esto odnosio na više lekovitih vrsta žalfija (*Salvia fruticosa*, *S. officinalis*, *S. pomifera*) (Bari evi i Bartol, 2000).

U XX veku je u jednoj medicinskoj školi u Salernu nazvana „*Salvia salvatrix*“ ili “spasonosna *Salvia*”, za koju su Stari Latini govorili: „*Cur moriatur homo cui salvia crescit in horto?*” - Zašto da umre ovek kome žalfija raste u vrtu?. Žalfija je ovu reputaciju zadržala i kroz Srednji vek - Karlo Veliki je od svih lekovitih biljaka najviše cenio žalfiju što se vidi po njegovom strogom zakonu u kome nalaže svim državnim imanjima (što su uglavnom bili manastiri) da moraju gajiti oko 100 vrsta lekovitih biljaka me u kojima je na prvom mestu bila žalfija (Dweck, 2000). Žalfija je u XVIII veku bila veoma popularna u Kini, gde su trgovci menjali dva sanduka najboljeg aja za jedan sanduk žalfije (Bari evi i Bartol, 2000).

Žalfije su veoma cenjeni prirodni konzervansi i kao za ini, pri emu komercijalne smeše za ina naj eš e sadrže listove *S. officinalis*, *S. fruticosa*, *S. lavandulifolia* i *S. pomifera*. Livadska žalfija (*S. pratensis*) se esto u ajevima koristi kao zamena za dalmatinsku žalfiju i za aromatizaciju piva i vina (Lawton, 2002; Garland, 2004).

***S. officinalis* (dalmatinska ili baštenska žalfija, kadulja)** je najšire kultivisana za inska, lekovita i ukrasna biljka ovog roda, nativna za Mediteran (Slika 6). Pre otkri a antibiotika, žalfija je bila naj eš a komponenta ajnih mešavina u tretmanu tuberkuloze (Bari evi i Bartol, 2000). Zbog antimikrobnog (etarsko ulje) i adstrigentnog dejstva (tanini), žalfija je koriš ena kao aktivni sastojak preparata za oralnu higijenu (smanjuje razvijanje plaka, spre ava upalu desni i deluje preventivno na razvoj karijesa) (Dweck, 2000). Listovi žalfije ispoljavaju niz bioloških dejstava: antioksidativno (ruzmarinska kiselina i diterpenska gorka jedinjenja), antibakterijsko, mikostati no, virustati no,

adstringentno i antihidrotik (Bari evi i Bartol, 2000). U velikim dozama etarsko ulje ove biljke deluje neurotoksi no i konvulzivno usled prisustva visokog procenta tujona (Dweck, 2000).

*S. lavandulifolia* (španska žalfija). Raste u Španiji i jugozapadnoj Francuskoj, a po sastavu etarskog ulja je veoma bliska *S. officinalis* i *S. fruticosa* (kamfor, 1,8-cineol, - i  $\beta$ -pinen), ali ne sadrži *cis*- i *trans*-tujon (Dweck, 2000) (Slika 6). Španska žalfija je tradicionalno koriš ena za poboljšanje memorije (Perry i dr, 1996, 2000; Topcu i Kusman, 2014), a novija istraživanja pokazuju da ova biljka ima veliki potencijal u tretmanu po etnih stadijuma AD (Perry i dr., 2000; 2003).



**Slika 6.** Izgled biljaka *S. officinalis* (levo, foto: A. Barra) i *S. lavandulifolia* (desno, foto: José María Escolano).

*S. fruticosa* (gr ka žalfija) je nativna za Mediteran i tradicionalno se konzumira kao osvežavaju i aj (Dinçer i dr., 2012) (Slika 7). Etarsko ulje *S. fruticosa* pokazuje sli an sastav kao *S. officinalis*, ali sa nižim procentom tujona (Delamare i dr., 2007) i pokazuje antibakterijsko, antiviralno, citotoksi no, antiinflamatorno i hipoglikemi no dejstvo, a sem toga biljka sadrži ruzmarinsku kiselinu i gorke diterpene (Sivropoulou i dr., 1997; Dweck, 2000; Delamare i dr., 2007; Dinçer i dr., 2012; Giweli i dr., 2013).

*S. pomifera* (kritska žalfija) je isto no-mediteranska vrsta, rasprostranjena u Gr koj i Maloj Aziji (Slika 7). *S. fruticosa* u Turskoj i *S. pomifera* u Gr koj se nazivaju „žalfijama

sa jabu icama“ (Bari evi i Bartol, 2000), jer se na njihovim listovima i gran icama nakom uboda osica formiraju gale veli ine do 2 cm (Slika 7) ispunjene želatinastim sadržajem koje se pakuju i prodaju kao specifi an slatkiš u Gr koj (Dweck, 2010). Lokalno stanovništvo koristi *S. pomifera*, znatno rasprostranjeniju na Kritu, za pripremu aja kao i *S. fruticosa* (Karousou i dr., 1998).



**Slika 7.** Izgled biljaka *S. fruticosa* (levo, foto: Aroche) i *S. pomifera* (u sredini, foto: Claire Forrest); gale kod žalfija (desno, foto: Erastos Kampouropoulos).

*S. sclarea* (muskatna žalfija) je nativna za južnu Evropu i kultivisana širom sveta zbog svog mirisa i lekovitih dejstava (Dweck, 2000; Gülçin i dr., 2004; Orhan i dr., 2007; Džami i dr., 2008; Schmiderer i dr., 2008) (Slika 8). Prvi put je upotrebljena u Nema koj u obliku infuza koji je dodavan u vino (Muscatel vino), a kasnije koriš ena za aromatizaciju likera, apsinta i drugih pi a (Dweck, 2000; Schmiderer i dr., 2008). Konkret (sklareol) i ulje (linalol i linalil-acetat) se koriste u parfimerijskoj industriji, a etarsko ulje i u aromaterapiji, jer deluje relaksiraju e i anksioliti no (Dweck, 2000; Džami i dr., 2008; Schmiderer i dr., 2008).

Koren *S. miltoirrhiza* (**Dan-Shen**) (Slika 8) se u Kini koristi kao terapijsko sredstvo kod kardiovaskularnih problema (posebno angine pektoris i infarkta miokarda), kod insomnije i kod problema sa menstrualnim ciklusom (Dweck, 2000; Bari evi i Bartol, 2000). Ekstrakt korena ove biljke sadži tanshionske diterpene, od kojih tanshion IIA deluje kao koronarni vazodilatator, antiaritmik i antiistemi ni agens, dok miltiron doprinosi

ukupnom sedativnom efektu ekstrakta i pomaže kod neurasteni ne insomnije (Dweck, 2000; Cui i dr., 2015).

Seme *S. hispanica* (**chia**) (Slika 8) su koristili još Asteci i Maje u obliku energenski bogate kaše (chia na majanskom zna i snaga) (Dweck, 2000), a 2009. godine je odobrena za korišćenje u ishrani od strane Evropskog parlamenta i Evropskog saveta (Capitani i dr., 2013). Seme je bogat izvor  $\omega$ -3-masnih kiselina, proteina i antioksidanasa. Seme potopljeno u vodu postaje izuzetno mukozno, proudukuju i 50 - 60 g/kg sluzi bogate vlaknima, polisaharidima i mukopolisaharidima (chia gel) koja se može koristiti kao ugušiva u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Dweck, 2000; Capitani i dr., 2013).



**Slika 8.** Izgled biljke *S. sclarea* (levo, foto: Réginald Hulhoven), korena *Salvia miltiorrhiza* (u sredini, foto: nepoznat autor), semena *S. hispanica* (desno, foto: Daniel Schwen).

*S. divinorum* (“**božanska žalfija**”). Mazatek Indijanci iz Meksika su koristili ovu biljku u obliku infuza za izazivanje halucinacija u svojim ritualima (Dweck, 2010), a danas se koristi kao legalni halucinogen u Kaliforniji i drugim delovima SAD (infuzom, žvakanjem svežih listova ili pušenjem). Samo iz ove biljke je izolovan neoklerodanski diterpen salvinorin A (divionorin A) koji deluje psihoaktivno i predstavlja jedini poznati diterpen sa halucinogenim dejstvom (Valdés i dr., 1994).

Rod *Salvia* obuhvata veliki broj ukrasnih vrsta, koje se gaje zbog svojih dekorativnih cvetova i/ili listova (Lawton, 2002), od kojih su neke prikazane na Slici 9. *S.*

*horminum* je jednogodišnja ukrasna vrsta sa velikim brojem varijeteta sa živopisno obojenim braktejama. *S. apiana* (bela žalfija) je severnoameri ka dekorativna i aromati na vrsta, koriš ena se u ritualima ameri kih Indijanaca. *S. elegans* (ananas - žalfija) je srednjoameri ka ornamentalna vrsta; gaji se kao ukrasni grm crvenih cvetova i listova, sa mirisom koji podse a na ananas. *S. splendens* (grimizna žalfija) - južnoameri ka ukrasna vrsta crvenih cvetova gajena širom sveta. *S. coccinea* je ukrasna meksi ka vrsta iji se jarko crveni cvetovi utrljavaju u obraze umesto rumenila. *S. patens*, sa intenzivno plavim cvetovima je nativna za planine u Meksiku.



**Slika 9.** Dekorativne vrste roda *Salvia*: nekoliko varijeteta *S. horminum* sa braktejama razli ite boje (levo, foto: Renee's Garden), *S. splendens* (u sredini, foto: nepoznat autor) i *S. elegans* (desno, foto: Gabriele Kothe-Heinrich).

### 1.3.3. Sekundarni metaboliti vrsta roda *Salvia*

Fitohemijski konstituenti vrsta roda *Salvia* su dobro opisani u literaturi i obuhvataju uglavnom etarska ulja, diterpene, triterpene, fenolne komponente (fenolne kiseline, kumarine, flavonoide i tanine) i druga jedinjenja kao što su masne kiseline (Tel i dr., 2010).

**Etarska ulja.** Sve vrste žalfija su izrazito aromati ne zahvaljuju i prisustvu etarskih ulja, mirisnih smeša isparljivih komponenti niske molekulske težine me u kojima dominiraju terpeni (uglavnom mono- i/ili seskviterpeni) (Bakkali i dr., 2008). Etarska ulja nekih od komercijalnih vrsta *Salvia* (*S. officinalis*, *S. fruticosa*, *S. lavandulifolia*, *S. sclarea*) uglavnom sadrže monoterpene. Glavne komponente u etarskom ulju *S. officinalis* (dalmatinska žalfija) su oksidovani monoterpeni - i  $\beta$ -tujon, 1,8-cineol, borneol, - i  $\beta$ -

pinen i kamfor (Veli kovi i dr., 2003; Miti - ulafi i dr., 2005; Delamare i dr., 2007; Ben Farhat i dr., 2009), dok je kamfor u drugim uzorcima odsustvovao (Stevi i dr., 2014). *S. lavandulifolia* (španska žalfija) je kao glavne komponente etarskog ulja sadržala kamfor, 1,8-cineol,  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen, bornil acetat (Perry i dr., 2000) i limonen (Stevi i dr., 2014). Etarsko ulje *S. triloba* (*S. fruticosa*) se uglavnom sastojalo od  $\alpha$ -tujona, 1,8-cineola, kamfora i  $\beta$ -kariofilena (Delamare i dr., 2007). Etarsko ulje *S. sclarea* je sadržalo i preko 80% linalola i linalil acetata (Džami i dr., 2008; Schmiderer i dr., 2008). Monoterpeni su bili glavne komponente u uljima tri vrste žalfija iz Grčke (Pitarokili i dr., 2006), dve vrste iz Srbije (Veli kovi i dr., 2002) i nekoliko vrsta iz Turske (Tepe i dr., 2004, 2005; Kelen i Tepe, 2008).

Seskviterpeni su bili dominantne komponente u etarskim uljima pet vrsta žalfija iz Irana sa najvećim procentima  $\beta$ -kariofilena (*S. nemorosa*, *S. virgata*, *S. verticillata*), germakrena B (*S. syriaca*) i  $\beta$ -ocimena (*S. reuterana*) (Mirza i Sefidkon; 1999; Sefidkon i Khajavi, 1999; Sefidkon i Mirza, 1999). Dominantne komponente etarskih ulja drugih vrsta žalfija iz Srbije, Grčke i Turske su bili seskviterpeni sa najvećim procentom spatulenola (*S. reflexa*) i kariofilen oksida (*S. nemorosa* i *S. glutinosa*) (Maleni i dr., 2004), viridoflorola (*S. argentea*) (Couladis i dr., 2001), kariofilen oksida (*S. glutinosa*) (Veli kovi i dr., 2003; Pitarokili i dr., 2006), germakrena D i  $\beta$ -kariofilena (*S. aethiopsis* i *S. chionantha*) (Veli kovi i dr., 2003; Güllüce i dr., 2006; Tel i dr., 2010).

Pokazano je da se različiti tipovi i podtipovi glandularnih trihoma međusobno razlikuju po načinu sekrecije i po distribuciji na biljnim organima iste individue, pa se etarska ulja dobijena iz različitih delova biljke značajno razlikuju po svom hemijskom profilu (Schmiderer i dr., 2008).

**Diterpeni.** Diterpeni su bili prisutni u etarskim uljima nekih vrsta *Salvia*, ali u veoma niskom procentu u poređenju sa drugim klasama jedinjenja (Veli kovi i dr., 2003; Pitarokili i dr., 2006; Kelen i Tepe, 2008). Među njima je najčešće identifikovan biciklični diterpenski alkohol sklareol (Pitarokili i dr., 2006; Kelen i Tepe, 2008; Schmiderer i dr., 2008), zatim fitol, izofitol i manol (Veli kovi i dr., 2003; Maleni i dr., 2004; Pitarokili i dr., 2006; Ben Farhat i dr., 2009; Tel i dr., 2010). Sklareol je prvi put izolovan iz *S. sclarea*

(Ulubelen i dr., 1994), pri čemu je u većem procentu prisutan u lipofilnim ekstraktima nego u etarskom ulju ove biljke (Schmiderer i dr., 2008). Iz ekstrakata vrsta roda *Salvia* izolovan je veliki broj diterpena, (feruginol, aetiopinon, salvipison, viridon, kandidisiol, salvisirianon), od kojih neki deluju antimikrobno i na kardiovaskularni sistem (Ulubelen i dr., 1994; Ulubelen, 2003).

Karnozolna kiselina i karnozol su dva glavna fenolna diterpena ekstrakata mnogih biljaka porodice Lamiaceae, u najvećem procentu prisutna kod žalfije i ruzmarina; kod žalfije su detektovani kod 48 (karnozolna kiselina), odnosno 27 vrsta (karnozol) (Abreu i dr., 2008). Ova jedinjenja, zajedno sa ruzmarinskom kiselinom su privukla pažnju istraživača zbog svog snažnog antioksidativnog dejstva (Lu i Foo, 2000; Abreu i dr., 2008). Sadržaj karnozola, karnozolne kiseline i metal karnozata je varirao u ekstraktima nekoliko vrsta žalfija iz Tunisa (Ben Farhat i dr., 2009; 2013a,b,c, 2014). Lekovita biljka *S. miltiorrhiza* proizvodi raznovrsne tanshinonske diterpene koji deluju kao vazorelaksansi i antiaritmici (Cui i dr., 2015). Iz *S. divinorum* je izolovan jedinstveni neoklerodanski diterpen, salvinorin A (divinorin A), koji deluje halucinogeno (Valdés i dr., 1994).

**Triterpeni.** Među najčešće prisutnim triterpenskim kiselinama u porodici Lamiaceae i rodu *Salvia* su oleinska (OA), ursolna kiselina (UA) i betulinska kiselina (BA) kojima se pripisuje niz bioloških aktivnosti i neznatna toksičnost u poređenju sa drugim sekundarnim metabolitima (Ulubelen, 2003; Janicsák i dr., 2006; Jäger i dr., 2009). Među 88 testiranih taksona porodice Lamiaceae, najviši procenat OA je izmeren u metanolnim ekstraktima *S. lavandulifolia* i *S. officinalis* (>1,5%), a UA u ekstraktima *S. officinalis* (>2,5 %), pri čemu je sadržaj UA uvek bio viši nego OA sa izuzetkom tri vrste *Salvia* (*S. jurisicii*, *S. staminea* i *S. verbenaca*) (Janicsák i dr., 2006). U ekstraktu listova *S. officinalis* sadržaj ovih kiselina je bio rangiran kao BA < OA < UA, pri čemu su višestruko veće vrednosti izmerene u listovima *R. officinalis* (Jäger i dr., 2009).

**Fenolne komponente.** U vrstama roda *Salvia* je identifikovano oko 160 različitih polifenola od kojih su neki prisutni samo u ovom rodu (Lu i Foo, 2002). Fenolna jedinjenja ovog roda su najintenzivnije istražena od strane grupe autora sa Novog Zelanda (Lu i Foo,

1999, 2000, 2001, 2002), koji su istakli da najveći i broj polifenola *Salvia* predstavlja fenolne kiseline (uglavnom derivate kafeinske kiseline) i flavonoide.

**Fenolne kiseline.** Kod roda *Salvia* detektovane su jednostavne kiseline (protokatehična, *p*-benzojeva, galna, kafeinska, vanilna, ferulna) i dehidroklavnska kiselina (Zgorška i Głowniak, 2001). Kafeinska kiselina predstavlja gradivni blok za biosintezu niza fenolnih kiselina i drugih fenolnih jedinjenja *Salvia*, po ev od jednostavnih monomera do kompleksnih oligomera (ferulna, klorogenska kiselina, klorogenska, salvianolinska kiselina A-J, kvercetin). Fenolna jedinjenja su uglavnom prisutna u slobodnom obliku mada su poznate i neke glikozilovane forme kao što je klorogenska kiselina-3-*O*'-glukozid (salviaflavon) (Lu i Foo, 2002). U ekstraktima različitih vrsta *Salvia* iz Tunisa identifikovane su galna, kafeinska, ferulna, *p*-hidroksibenzojeva, klorogenska i u najvećem procentu klorogenska kiselina (Ben Farhat i dr., 2009, 2013a,b,c; 2014). Orhan i dr. (2012) su našli 11 različitih fenolnih kiselina u ekstraktima 16 vrsta žalfije iz Turske, uključujući i klorogensku kiselinu prisutnu u najvećoj količini (0,24 - 153,50 mg/100g).

**Flavonoidi.** Ova klasa sekundarnih metabolita je široko rasprostranjena kod vrsta roda *Salvia* i to uglavnom u formi flavona i flavonola i njihovih glikozida, dok su flavanoni prisutni u nešto manjem procentu (Lu i Foo, 2002). U sedam analiziranih vrsta *Salvia*, Khazarian i dr. (2013) su identifikovali 53 flavonoida, od kojih su najzastupljeniji bili flavoni (35,70%), a sem toga su bili prisutni flavonoli, flavanoni, izoflavoni, dihidroflavonoli i halkoni (Khazarian, 2013, 2014).

Flavoni su uglavnom predstavljeni apigeninom i luteolinom i njihovim metil-eterima (genkvanin, hrizohiol, diosmetin). Od 6-hidroksilovanih derivata apigenina i luteolina opisani su cirsimarin, salvigenin, nepetin, cirsiol, eupatorin, hispidulin, skutelarin) koji mogu biti od taksonomskog značaja za ovaj rod. Većina flavonola identifikovanih u vrstama *Salvia* su 3-metil-epikempferol ili kvercetin (izokempferid, izoramnetin i dr.) (Lu i Foo, 2002). U vrstama roda *Salvia* iz Tunisa identifikovani su apigenin, luteolin i njihovi 7-*O*-glukozidi, genkvanin, naringin, naringenin, hesperetin, cirsiol, cirsimarin i salvigenin (Ben Farhat, 2009; 2013a,b,c; 2014).



Antocijanini su u velikom procentu zastupljeni u žalfijama sa crvenim ili purpurnim kruni nim listi ima. Pigment salvianin (diglukozid pelargonidina) je identifikovan 1916. godine, a kasnije je utvr eno da se velike varijacije u boji cvetova *Salvia* mogu pripisati razli itoj distribuciji derivata pelargonidina (crvena, ljubi asto-crvena i ruži asta), delfinidina (plava) i cijanidina (ljubi asta) (Lu i Foo, 2002).

Flavonoidi, zajedno sa fenolnim kiselinama i terpenima predstavljaju nosioce bioloških aktivnosti kod familije Lamiaceae (Vladimir-Kneževi i dr., 2014). Sem toga, rezultati fitohemijskih istraživanja roda *Salvia* u Iranu Khazarian (2013, 2014) su ukazala da flavonoidi mogu biti veoma zna ajni hemotaksonomski markeri u ovom rodu. Morfološki sli ne i taksonomski problemati ne vrste *S. nemorosa* i *S. virgata* su kona no razdvojene na osnovu profila flavonoida (Khazarian, 2014).

**Tanini.** Protoantocijanidini ili kondenzovani tanini su prisutni kod roda *Salvia* od kojih je derivat katehina, salviatanin, specifi no prisutan u ovom rodu (Lu i Foo, 2002).

### 1.3.4. Biološke aktivnosti vrsta roda *Salvia*

Mnogobrojne studije su pokazale da etarska ulja i ekstrakti vrsta roda *Salvia* ispoljavaju širok spektar *in vitro* i *in vivo* bioloških dejstava, koja su sumarno prikazana u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Pregled literaturnih podataka o biološkim dejstvima roda *Salvia*.

Biološko dejstvo	Referenca
antioksidativno	Cuvelier i dr. (1994); Zupkó i dr. (2001); Pizzale i dr. (2002); Couladis i dr. (2003); Miliauskas i dr. (2004); Kamatou i dr. (2005, 2007, 2008a, 2010); Matkowski i Piotrowska (2006); Nickavar i dr (2007); Orhan i dr. (2007; 2012; 2013); Tepe i dr. (2004, 2005, 2006, 2007); Tawaha i dr. (2007); Wojdylo i dr. (2007); Akkol i dr. (2008); Kelen i Tepe (2008); Matkowski i dr. (2008a,b); Tepe (2008); Kivrak i dr. (2009); Sultana i dr. (2009); Ben Farhat i dr. (2009, 2013a,b,c, 2014, 2015); Tosun i dr. (2009); Asadi i dr. (2010); Chrpova i dr. (2010); Janicsák i dr. (2010); enol i dr. (2010a); Javdan i Estakhr (2011); Ko ar i dr. (2011); Hussain i dr. (2011); Lee i dr. (2011a); Lin i dr. (2011); Nikolova (2011); Suntar i dr. (2011);

	Dinçer i dr. (2012, 2013); Stagos i dr. (2012); Firuzi i dr. (2013); Giweli i dr. (2013); Kontogianni i dr. (2013); Roby i dr. (2013); Generali -Mekini i dr. (2014); Skotti i dr. (2014); Tusevski i dr. (2014); Vladimir-Kneževi i dr. (2014); Bahadori i Mirzaei (2015); Martins i dr. (2015)
<b>antibakterijsko antifungalno antiviralno</b>	Sivropoulou i dr. (1997); Tzakou i dr. (2001); Veli kovi i dr. (2002, 2003); Tepe i dr. (2004, 2005); Kamatou i dr. (2005, 2007, 2008a); Sonboli i dr. (2006); Delamare i dr. (2007); Arslan i Celik (2008); Dulger i Hacıoglu (2008); Džami i dr. (2008); Kelen i Tepe (2008); Šavikin i dr. (2008); Tepe (2008); Askun i dr. (2009); Cardile i dr. (2009); Kivrak i dr. (2009); Žižovi i dr. (2009); Petrovi i dr. (2009); Pierozan i dr. (2009); Sokovi i dr. (2009); Šavikin i dr. (2008); Javdan i Estrakhr (2011); Karcioglu i dr. (2011); Lee i dr. (2011a); Ibrahim (2012); Abu-Darwish i dr. (2013); Firuzi i dr. (2013); Giweli i dr. (2013); Karamian i dr. (2013); Generali -Mekini i dr. (2014); Mosafa i dr. (2014); Stevi i dr. (2014); Martins i dr. (2015);
<b>antikancerogeno, antiproliferativno, citotoksi no</b>	Kamatou i dr. (2005, 2008a,b); Fiore i dr. (2006, 2012); Janicsák i dr. (2007, 2011); Loizzo i dr. (2007); Cardile i dr. (2009); Xavier i dr. (2009a,b); Al-Kalaldehy i dr. (2010); Janicsák i dr. (2007, 2011); Tundis i dr. (2011); Abu-Darwish i dr. (2012); Abu-Dahab i dr. (2012); Firuzi i dr. (2013); Bahadori i Mirzaei (2015)
<b>antineurodegenerativno/ neuroprotektivno</b>	Perry i dr. (1996, 2000, 2003); Akhondzadeh i dr. (2003); Savalev i dr. (2003); Kang i dr. (2004); Kennedy i dr. (2006); Orhan i dr. (2007, 2008, 2012, 2013); Kivrak i dr. (2009); Orhan i Arslan (2009); Asadi i dr. (2010); enol i dr. (2010a); Lee i dr. (2011a); Lin i dr. (2011); Suntar i dr. (2011); Barabadian i dr. (2012); Demirezer i dr. (2014); Jafari i dr. (2015)
<b>antiinflamatorno/ antinocioceptivno/ analgeti no</b>	Perry i dr. (2000, 2003); Bari evi i Bartol (2000); Imanshahidi i Hosseinzadeh (2006); Akkol i dr. (2008); Kamatou i dr. (2008a, 2010); Jung i dr. (2009); Abdel-Moein i dr. (2011); Eidi i dr. (2011); Ustun i Sezik (2011); Ibrahim (2012); Rodrigues i dr. (2012); Abu-Darwish i dr. (2013);
<b>sedativno/ halucinogeno</b>	Valdes i dr. (1994); Perry i dr. (1996, 2000, 2003); Imanshahidi i Hosseinzadeh (2006); Nugroho i dr. (2012)
<b>fitoestrogeno</b>	Perry i dr. (2000, 2003); Adaay i dr. (2013)
<b>antidijabeti no/ hipoglikemijsko</b>	Bari evi i Bartol (2000); Eidi i Eidi (2009); Jafari i dr. (2015)
<b>kardio-, gastro i hepatoprotektivno/ imunomodulatorno</b>	Bari evi i Bartol (2000); Kolak i dr. (2001); Ulubelen (2003); Mayer i dr. (2009); Wang (2010); Ziaei i dr. (2011); Nugroho i dr. (2012); Shahrzad i dr. (2014)
<b>insekticidno/ larvicidno</b>	Pavela i dr. (2008); Pavela i Neugebauerová (2008)
<b>antigerminativno/ alelopatsko</b>	Bari evi i Bartol (2000); De Martino i dr. (2010)

U nastavku će biti izložen detaljniji pregled literature o antioksidativnoj, antimikrobnoj, antineurodegenerativnoj i citotoksičnoj aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda *Salvia*, kao i o sekundarnim metabolitima koji doprinose biološkim dejstvima ovih biljaka.

### 1.3.4.1. Antioksidativna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda *Salvia*

Etarska ulja i ekstrakti vrsta roda *Salvia* veoma efikasno eliminišu slobodne radikale zahvaljujući svojim glavnim aktivnim komponentama kao što su terpeni i polifenoli (Fu i dr., 2013). Evaluacija antioksidativne aktivnosti vršena je primenom različitih testova (DPPH, ABTS, FRAP, β-karoten/linolna kiselina test i dr.) zasnovanih na različitim mehanizmima reakcije, gde su rezultati mnogobrojnih studija saglasni u tome da su brojne vrste roda *Salvia* iz Turske (Tepe i dr., 2004, 2005, 2006; Orhan i dr., 2007, 2012, 2013; Akkol i dr., 2008; Tepe, 2008; Enol i dr., 2010a; Tosun i dr., 2010; Koar i dr., 2011; Dinçer i dr., 2012, 2013), Južnoafričke republike (Kamatou i dr., 2005, 2007, 2010), Tunisa (Ben Farhat i dr., 2009, 2013a,b,c, 2014, 2015), Grčke (Stagos i dr., 2012; Skotti i dr., 2014) i drugih zemalja pokazale visok antioksidativni kapacitet.

Literaturni podaci ukazuju na široke varijacije u antioksidativnoj aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata *Salvia* koje se uglavnom pripisuju razlikama u biljnom materijalu (biljna vrsta, deo biljke, lokalitet, sezona, fenološka faza) i/ili razlikama u ekstrakcionoj proceduri i metodi za evaluaciju antioksidativne aktivnosti (izbor procedure i eksperimentalni uslovi). Istraživači su saglasni da je antioksidativna aktivnost jako i pozitivno korelisana sa sadržajem aktivnih komponenti (fenolnih jedinjenja i terpena) u etarskim uljima i ekstraktima žalfija.

Cuvelier i dr. (1994) su istakli da su glavne antioksidativne komponente *S. officinalis* diterpenski derivati (karnozol, karnozolna kiselina, rosmadial, rozmanol, epirozmanol i metal karnozat), od kojih su kafena i ruzmarinska kiselina efikasnije neutralisale slobodne radikale u odnosu na flavonoidne glikozide luteolin i apigenin (Lu i Foo, 2001). Hloroformska i vodena frakcija etanolnog ekstrakta, ruzmarinska kiselina,

luteolin i dominantne monoterenske komponente etarskog ulja (1,8-cineol,  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen, linalol i karvakrol) *S. lavandulifolia* su ispoljili antioksidativno dejstvo, dok je kamfor delovao prooksidativno (Perry i dr., 2003).

### 1.3.4.2. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda *Salvia*

*S. officinalis* (dalmatinska žalfija) se tradicionalno koristi za ispiranje usta i grla zbog svog antiseptičnog dejstva, koje je potvrđeno nizom studija (Mitić i dr., 2005; Delamare i dr., 2007; Žižović i dr., 2009). Literaturni podaci pokazuju da su različite vrste žalfija, a naročito njihova etarska ulja efikasno inhibirala rast najčešćih bakterijskih patogena: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Micrococcus* sp., *Proteus* sp. i dr. (Sivropoulou i dr., 1997; Tzakou i dr., 2001; Tepe i dr., 2004, 2005; Kamatou i dr., 2007; Kelen i Tepe, 2008; Šavikin i dr., 2008; Askun i dr., 2009; Cardile i dr., 2009; Javdan i Estrakhr, 2011; Ibrahim, 2012; Firuzi i dr., 2013).

Slično drugim lekovitim biljkama, žalfije su efikasnije inhibirale rast Gram-pozitivnih u poređenju sa Gram-negativnim bakterijama, što Nikaido (1996, 2003) objašnjava razlikama u strukturi ćelijskog zida kod ove dve grupe bakterija. U studiji Stević i dr. (2014), etarska ulja *S. officinalis* i *S. lavandulifolia* su ispoljila značajno antifungalno dejstvo na 21 testiranu mikromicetu. Različite patogene mikromicete rodova *Candida*, *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Microsporum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Phomopsis*, *Bortyitis* i dr. su pokazale osetljivost na tretmane etarskim uljima i ekstraktima različitih vrsta žalfija (Veličković i dr., 2002; Dulger i Hacıoğlu, 2008; Džamić i dr., 2008; Soković i dr., 2009; Karcioglu i dr., 2011; Abu-Darwish i dr., 2013).

Etarska ulja su se pokazala kao snažniji antimikrobni agensi u odnosu na biljne ekstrakte zahvaljujući tome što u njihov sastav ulaze lipofilni molekuli niske molekulske mase koji lakše prolaze kroz ćelijsku membranu bakterije ili mikromicete (Cowan, 1999). Veći broj studija je potvrdio da aktivne komponente lipofilnih frakcija ekstrakata pokazuju

snažnije antimikrobno dejstvo u odnosu na hidrofilne komponente što se objašnjava efektivnijim transportom kroz elijsku membranu patogena (Tepe i dr., 2004, 2005; Arslan i Celik, 2008). Sonboli i dr. (2006) su zaključili da etarska ulja vrsta roda *Salvia* ispoljavaju antimikrobno dejstvo zahvaljujući i sinergizmu između glavnih komponenti (linalol, 1,8-cineol,  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -kariofilen i limonen) i drugih komponenti ulja. U ekstraktima žalfija identifikovan je veći broj antimikrobnih komponenti uključujući i abietanske diterpene (Topcu i Goren, 2007) i polifenole (fenolne kiseline, flavonoide i tanine) (Cowan, 1999; Lee i dr., 2010).

### 1.3.4.3. Citotoksi na aktivnost etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda *Salvia*

Etarska ulja i ekstrakti vrsta roda *Salvia* su pokazali antiproliferativno i citotoksično dejstvo na elijske linije humanih kancera. Iz pojedinih vrsta su izolovani aktivni principi citotoksičnog delovanja i uglavnom su svrstani u grupe biljnih fenola i terpena (Wahle i dr., 2010; Batra i Sharma, 2013; Firuzi i dr., 2013; Fantini i dr., 2015). Citotoksično dejstvo se uglavnom ostvaruje kroz indukciju apoptoze što je potvrđeno studijama Xavier i dr. (2009 a,b) gde su vođeni ekstrakti *S. officinalis* i *S. fruticosa* i ruzmarinska kiselina, kao dominantno fenolno jedinjenje ovih ekstrakata, indukovali elijsku smrt u dve elijske linije kolorektalnog karcinoma. Etarsko ulje *S. fruticosa* i njegove glavne komponente (1,8-cineol,  $\alpha$ - i  $\beta$ -tujon i kamfor) su pokazali visoku toksičnost na Vero elije (Sivropoulou i dr., 1997), dok je etanolni ekstrakt ove biljke pokazao najizrazitiju antiproliferativnu aktivnost u poređenju sa drugim testiranim biljkama (Al-Kalaldehy i dr., 2010).

Metanolni ekstrakti šest vrsta *Salvia* iz Irana, a posebno *S. menthaefolia* su pokazali citotoksično dejstvo na više elijskih linija (Fiore i dr., 2006, 2012). Tretman etarskim uljima *S. rubifolia* i *S. bracteata* je uzrokovao apoptozu elija humanog melanoma što je pripisano prisustvu različitih seskviterpena (Cardile i dr., 2009) i što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za etarska ulja tri vrste *Salvia* iz Libana (Russo i dr., 2016). Devet vrsta *Salvia* iz Jordana su ispoljile snažan citotoksični efekat na četiri linije kancera dojkama sa IC<sub>50</sub> vrednostima između 5 - 200  $\mu\text{g/mL}$  (Abu-Dahab i dr., 2012).

Dihlorometanski ekstrakti 11 iranskih vrsta *Salvia* su pokazali viši citotoksi ni potencijal u odnosu na metanolne ekstrakte (Firuzi i dr., 2013). Napolarni ekstrakti *S. lerifolia* su pokazali visoku toksi nost na nekoliko testiranih linija kancera, dok je njihov konstituent naringenin ispoljio dejstvo blisko vinblastinu (Tundis i dr., 2011). Luteolin, kvercetin i ursolna kiselina, identifikovani kod nekoliko vrsta žalfija, tako e ostvaruju antiproliferativno dejstvo mehanizmom indukcije apoptoze (Xavier i dr., 2009b). Ve i broj abietanskih diterpena izolovanih iz turskih vrsta žalfije, a naro ito taksidion, deluju citotoksi no na elijske linije humanog kancera (Topcu i Goren, 2007).

#### 1.3.4.4. Antineurodegenerativna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata vrsta roda *Salvia*

Neke vrste žalfija (*S. officinalis* i *S. lavandulifolia*) su tradicionalno koriš ene protiv gubitka memorije u Evropi (Perry i dr, 1996; Topcu i Kusman, 2014), dok je koren *S. miltiorrhiza* cenjen u kineskoj tradicionalnoj medicini, jer poboljšava memoriju i cirkulaciju krvi u mozgu (Topcu i Kusman, 2014). Etarska ulja i ekstrakti pojedinih vrsta *Salvia*, a posebno *S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *S. triloba* i *S. miltiorrhiza*, snažno inhibiraju holinerški aktivnost enzima AChE i BuChE zbog ega predstavljaju ozbiljne kandidate za terapiju po etnih stadujuma AD (Perry i dr., 1996, 2003; Akhondzadeh i dr., 2003; Savalev i dr., 2003; Kennedy i dr., 2006; Orhan, 2007, 2012, 2013; Orhan i Arslan, 2009; enol i dr., 2010a; Barabadan i dr., 2012; Topcu i Kusman, 2014).

Znatno je manje literaturnih podataka o aktivnosti žalfija kao inhibitora TYR. Ekstrakti nekoliko vrsta žalfija gajenih na Tajvanu su bili u potpunosti inaktivni (Lee i dr., 2011a), dok su 16 vrsta žalfije iz Turske pokazale slabu inhibiciju TYR (Orhan i dr., 2012). Sli ne rezultate su dobili Lin i dr. (2011) i Suntar i dr. (2011) testiraju i vodene i etanolne ekstrakte nekoliko vrsta *Salvia* iji su procenti inhibicije TYR bili ispod 15%.

Smatra se da su glavni nosioci AChE aktivnosti žalfija monoterpeni, diterpeni (sklareol, manool, feruginol, karnozol, karnozolna kiselina) i triterpeni (oleinska i ursinska kiselina) (Topcu i Kusman, 2014). Etarsko ulje *S. lavandulifolia* i glavne monoterpenške

komponente -pinen, kamfor i posebno 1,8-cineol deluju kao nekompetitivni reverzibilni inhibitori AChE (Perry i dr., 2000; 2003). S obzirom da su oksidativni stres i hroni na inflamacija u tesnoj vezi sa nastankom neurodegenerativnih bolesti (Topcu i Kusman, 2014), polifenoli *Salvia* su izuzetno važna grupa jedinjenja, jer u estvuju u antioksidativnoj zaštiti (Kim i Uyama, 2005; Wang i dr., 2006; Chang, 2009; Roseiro i dr., 2012; Xie i dr., 2014). Sem toga, flavonoidi kao što su kempferol i kvercetin mogu direktno i ireverzibilno inhibirati tirozinazu nagra ivanjem helata sa jonom bakra iz aktivnog centra ovog enzima (Kim i Uyama, 2005). Smatra se da navedena jedinjenja biljaka deluju sinergisti ki, jer su se etarska ulja i ukupni ekstrakti pokazali kao potentniji inhibitori enzima nego pojedina na jedinjenja (Topcu i Kusman, 2014).

### 1.4. Rod *Salvia* u flori Makedonije

U flori Evrope je zastupljeno 36 vrsta roda *Salvia* grupisanih u 7 sekcija, od kojih *Salvia* (11 spp.) i *Plethiosphace* (14 spp.) obuhvataju najve i broj vrsta (Hedge, 1972). Sekcija *Salvia* (*Eusphace* Benth) obuhvata žbunove ili višegodišnje zeljaste biljke. Gornja usna krunice je manje-više prava, a kruni na cev poseduje venac trihoma sa unutrašnje strane. Konektiv je jednak, kra i ili iste dužine kao filament. Vrste sekcije *Plethiosphace* su višegodišnje, retko dvogodišnje biljke. Gornja usna krunice je prava ili kukasta, a kruni na cev bez venca trihoma sa unutrašnje strane. Konektiv je duži od filamenta (Hedge, 1972).

U flori Republike Makedonije je konstatovano 15 vrsta (Matevski) (nepublikovani rezultati), od kojih *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* pripadaju sekciji *Plethiosphace*, a *S. ringens* sekciji *Salvia* (Hedge, 1972). U nastavku e biti dat opis, rasprostranjenje i pregled istraživanja ove tri vrste iz flore Republike Makedonije.

### 1.4.1. *Salvia amplexicaulis* Lam.

**Opis:** *S. amplexicaulis* je višegodišnja zeljasta biljka, visine do 80 cm. Stablo je uspravno, u gornjem delu metli asto-razgranato i gusto pokriveno dlakama. U donjem delu stabla listovi su sa kratkim drškama ili gotovo sede i; srednji i gornji listovi su sede i, srcastom osnovom obavijaju stablo; duž celog oboda su tupo nazubljeni. Listovi su na licu manje-više glatki ili goli, a na nali ju ble i i gusto pokriveni dlakama. Brakteje su srcasto-jajaste, celog oboda, iste dužine kao ašica, esto ljubi aste boje i dlakave spolja. Cvetovi su duga ki 10 - 12 mm, sa kratkom cvetnom drškom, po 6 - 8 skupljeni u prividne, zbijene pršljenove. ašica je zvonasta, dvousnata, sa tri kratka zupca na gornjoj i dva duga ka na donjoj usni, dužine 6 - 8,5 mm. Krunica dvousnata, plavo-ljubi aste boje, duga ka 8,5 - 12 mm, a kruni na cev je iste dužine kao ašica. Prašnici ne vire iz krunice, a stubi je znatno duži (Hedge, 1972; Dikli , 1974) (Slika 10).



**Slika 10.** Izgled *S. amplexicaulis* (foto: nepoznat autor).

**Rasprostranjenje:** Ova vrsta je rasprostranjena na Balkanskom poluostrvu, na podru jima Albanije, Bugarske, Gr ke, bivše Jugoslavije, evopskog i azijskog dela Turske (Hedge, 1972).

**Pregled istraživanja:** Petrovi i dr. (2009) i Veli kovi i dr. (2012) su analizirali sastav etarskog ulja *S. amplexicaulis* sakupljene sa dva lokaliteta u Srbiji. U oba uzorka su bili dominantni seskviterpeni, sa germakrenom D, viridoflorolom, kariofilen oksidom i β-



kariofilenom kao glavnim komponentama. Rzepa i dr. (2009) su pomoću HS-GC-MS (*Head-space* gasna homotografija-masena spektroskopija) kao glavne komponente ulja *S. amplexicaulis* identifikovali kamfen,  $\beta$ -hamigren i tujol. Etarsko ulje je pokazalo značajnije antimikrobno dejstvo na rast Gram-pozitivnih bakterija i *Candida albicans* u poređenju sa Gram-negativnim bakterijama (Petrović i dr., 2009). Kolak i dr. (2001) i Ulubelen (2003) su pokazali vazodepresivno dejstvo ekstrakta i pojedinih jedinjenja izolovanih iz korena *S. amplexicaulis* (diterpenoidi 1,7-okso-abieta-9,12,14-trien, feruginol i steroidno jedinjenje stigmast-4-en-3-on). Među ekstraktima 16 vrsta *Salvia* iz Turske, etil acetatni i posebno metanolni ekstrakt *S. amplexicaulis* su pokazali značajno antioksidativno i antineurodegenerativno dejstvo u nekoliko paralelnih testova (Orhan i dr., 2012). Triterpenske kiseline, kao oleinska i ursolna kiselina, su bile prisutne u visokom procentu u ekstraktu ove biljke (Janicsák i dr., 2006). Ekstrakt *S. amplexicaulis* gajene u Eškoj je pokazao relativno visok sadržaj ukupnih fenola i ruzmarinske kiseline u poređenju sa drugim vrstama *Salvia* (Muráriková i dr., 2015).

### 1.4.2. *Salvia jurisicii* Košanin

**Opis:** Stabla su difuzno granata, visine do 60 cm, gusto pokrivena dugačkim dlakama i nose veliki broj listova celom dužinom. Listovi su perasti, sa 4 - 6 parova uzanih linearnih segmenata. Cvasti su rastresite, razgranate, sa 4 - 6 cvetova gusto složenih u pršljene. Cvetovi su na drškama; čašica je dugačka 3 - 5 mm, sa kratkim mehaničkim i tačkastim glandularnim trihomama; krunica je plavo-ljubičasta, resupinatna (9 - 12 mm). Prašnici ne vire ili malo vire iz cveta (Hedge, 1972). Predstavlja atraktivnu dekorativnu biljku, jer poseduje neobične peraste listove i guste cvasti sa zašiljenim ljubičasto-plavim cvetovima (Slika 11).

**Rasprostranjenje:** Ova vrsta je endemična za centralni deo Makedonije, gde naseljava sušna staništa (Hedge, 1972). Uključena je u nacionalnu CORINE listu kao vrsta sa ograničenom distribucijom, odnosno kao vrsta čije stanište ugroženo pojedinih antropogenim delatnostima (Smith, 2003).



**Slika 11.** Izgled *S. jurisicii* (foto: nepoznat autor).

**Pregled istraživanja:** Kao glavne komponente u etarskom ulju *S. jurisicii*, Rzepa i dr. (2009) su identifikovali kamfen, tujol, tujonen i kamfor. Janicsák i dr. (2006) su prou avali sadržaj triterpenskih kiselina (oleinske i ursolne) u metanolnim ekstraktima 88 vrsta familije Lamiaceae i primetili da je sadržaj oleinske kiseline bio ve i od sadržaja ursolne kiseline sa izuzetkom tri vrste, me u kojima je bila *S. jurisicii*. Janicsák i dr. (2010) su našli nizak antioksidativni kapacitet metanolno-vodenog ekstrakta *S. jurisicii* u pore enju sa ostalim vrstama roda *Salvia*. Abreu i dr. (2008) su prou avali sadržaj dva diterpena (karnozolne kiseline i karnozola) i -tokoferola u metanolnim ekstraktima listova 60 vrsta *Salvia*. Karnozolna kiselina i -tokoferol su bili prisutni u uzorku *S. jurisicii*, dok karnozol nije detektovan. Sajewicz i dr. (2011, 2012) su u ekstraktima *S. jurisicii* gajene u Poljskoj identifikovali kafenu, hlorogensku, ruzmarinsku, feruli nu kiselinu i kumarin. Sadržaj ukupnih fenola i ruzmarinske kiseline u ekstraktima *S. jurisicii* kultivisane u eškoj je bio najniži me u 37 uzoraka *Salvia* (Muráriková i dr., 2015). U studiji koja je obuhvatila metanolne ekstrakte 21 vrste *Salvia*, Pavela i Neugebauerová (2008) su našli da ekstrakt *S. jurisicii* pokazuje najniži larvicidni kapacitet. Kao i druge vrste roda *Salvia*, *S. jurisicii* i *S. amplexicaulis* su pokazale sposobnost da eliminišu štetan bisfenol A iz zemljišta (Okuhata i dr., 2010), pa mogu biti od velikog zna aja u fitoremedijaciji.

### 1.4.3. *Salvia ringens* Sibth. & Sm.

**Opis:** *S. ringens* je višegodišnja zeljasta biljka, visine do 60 cm. Naseljava sušna kamenita staništa i travnate površine. Stabla su uspravna, nerazgranata ili slabo metliasto granata u gornjem delu i pokrivena mehaničkim dlakama. Listovi su krupni, skupljeni u prizemnu rozetu, dugački 7 - 15 cm i nepravilno perasto deljeni; terminalni reznjanj je veliki i simetričan, a 3 - 6 pari bočnih reznjanja su sitniji i jajastog oblika. Listovi su sa dobro razvijenim lisnim drškama, na licu tamnozeleni, a na nali su pokriveni gustim i dugim dlakama. Listovi su duž stabla malobrojni; brakteje su jajaste i gusto obrasle dlakama. Po 2 - 4 krupnih cvetova je skupljeno u pršljenove. Cvetne drške su dobro razvijene, sa dve eliptične brakteole u osnovi. Specifičan epitet *ringens* se odnosi na širokootvorene dvousnate cvetove. Čašica je dužine 10 - 17 mm, dvousnata i deljena na zupce, na kojima su utisnute glandularne trihome. Krunica je dugačka oko 40 mm, ljubičasta i asto-plave ili plave boje i dvousnata; gornja usna krunice prava, na vrhu urezana. Prašnici su malo kraći, a stubi malo duži od krunice. Orašice su veličine 3 - 3,5 mm, trostrane, tamno mrke boje, bradavičaste (Hedge, 1972; Dikli, 1974; Lawton, 2002). Ova biljka je visoko cenjena ukrasna i medonosna biljka, zahvaljujući i atraktivnoj lisnoj rozeti, krupnim ljubičastim cvetovima i intenzivnom, veoma prijatnom mirisu (Slika 12).



**Slika 12.** Izgled *S. ringens* (levo, foto: nepoznat autor; u sredini i desno, foto: A. Alimpi ).

**Rasprostranjenje:** Ova biljka je rasprostranjena na sušnim staništima južnih i isto nih delova Balkanskog poluostrva, šire i se sve do jugoisto ne Rumunije (Hedge, 1972).

**Pregled istraživanja:** Monoterpeni 1,8-cineol i -pinen su glavne komponente etarskih ulja *S. ringens* iz Gr ke i Makedonije (Tzakou i dr., 2001; Šavikin i dr., 2008), dok su kamfor i borneol dominirali u uzorku iz Bugarske (Georgiev i dr., 2013). Etarsko ulje ove biljke i njegove izolovane komponente su pokazale zna ajno antimikrobno dejstvo protiv razli itih bakterijskih sojeva i *C. albicans* (Tzakou i dr., 2001; Šavikin i dr., 2008), dok literaturni podaci o antimkirobnom dejstvu ekstrakata nisu dostupni. Glavna fenolna komponenta metanolnog ekstrakta *S. ringens* iz Rumunije je ruzmarinska kiselina, a ostale komponente (kafena, p-kumarinska i hlorogenska kiselina, derivati luteolina i apigenina) su prisutne u znatno manjim koli inama (Coisin i dr., 2012).

Couladis i dr. (2003) su prou avali antioksidativnu aktivnost ekstrakata 21 biljke iz Gr ke Umezawa metodom i našli da metanolni ekstrakt *S. ringens* pokazuje sli no dejstvo kao -tokoferol. Me u 27 lekovitih biljaka razli itih familija, sakupljenih u Makedoniji, naj snažnije antioksidativno dejstvo korelisano sa sadržajem ukupnih fenola, flavonoida i fenilpropanoida su pokazali ekstrakti *Origanum vulgare*, *Melissa officinalis* i *Salvia ringens* (Tusevski i dr., 2014). Mnogi istraživa i su uo ili snažnu korelaciju izme u sadržaja ukupnih fenola i snažne antioksidativne aktivnosti *S. ringens* (Nikolova, 2011; Coisin i dr., 2012; Tusevski i dr. 2014). Ekstrakti i pojedine komponente izolovane iz korena *S. ringens* su ispoljile snažno citotoksi no dejstvo na nekoliko elijskih linija humanog karcinoma (Janicsák i dr., 2007, 2011). U odnosu na druge vrste roda *Salvia*, metanolni ekstrakt je pokazao slabo larvicidno dejstvo na larve *Culex quinquefasciatus* (Pavela, 2008).

## 2. CILJ RADA

Na osnovu prezentovanih literaturnih podataka može se uo iti da:

- ✧ rod *Salvia* pokazuje diverzitet mikromorfoloških karakteristika po kojima se vrste ovog roda me usobno razlikuju u zna ajnoj meri;
- ✧ vrste roda *Salvia* su veoma bogate razli itim sekundarnim metabolitima, naro ito etarskim uljima i fenolnim komponentama;
- ✧ etarska ulja i ekstrakti vrsta roda *Salvia* ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti;
- ✧ vrste ovog roda iz flore Republike Makedonije su delimi no istražene ili u potpunosti neistražene sa navedenih aspekata.

Imaju i u vidu izneta zapažanja, **cilj ovog rada je analiza mikromorfoloških i anatomskih karakteristika, hemijskog sastava i bioloških aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata vrsta *S. amplexicaulis*, *S. jurisicii* i *S. ringens* iz flore Republike Makedonije.**

Postavljeni su slede i **zadaci istraživanja:**

- ✧ analiza mikromorfoloških i anatomskih karakteristika vegetativnih i generativnih organa tri vrste žalfija, a posebno njihovih glandularnih trihoma kao mesta sekrecije brojnih sekundarnih metabolita;
- ✧ analiza hemijskog sastava etarskih ulja i analiza fenolnih komponenti dihlorometanskih, etil acetatnih, metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata dobijenih od tri vrste žalfija;
- ✧ ispitivanje potencijalnih bioloških aktivnosti (antioksidativna, antimikrobna, citotoksi na i antineurodegenerativna) etarskih ulja i ekstrakata tri vrste žalfija.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Biljni materijal**

Za potrebe ovog rada, vršena su terenska istraživanja na teritoriji Republike Makedonije 2011. i 2012. godine i prikupljen je biljni materijal tri vrste roda *Salvia*: *S. amplexicaulis*, *S. jurisicii* i *S. ringens* (Slike 13-15) u fazi punog cvetanja i/ili na kraju faze cvetanja. Determinaciju vrsta roda *Salvia* su izvršili prof. dr Vlado Matevski i prof. dr Petar D. Marin. Vau eri su deponovani u Herbarijumu Instituta za botaniku i Botani ke bašte "Jevremovac" Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Tabela 2).

Za potrebe mikroskopskih analiza, uzorci su sakupljeni 2011. godine (sezona A, Tabela 2). Za analize skeniraju im elektronskim mikroskopom, uzorci su snimani bez prethodne pripreme, dok su za analize svetlosnim i transmisionim elektronskim mikroskopom fiksirani po propisanoj proceduri neposredno po sakupljanju. Biljni materijal za fitohemijska istraživanja je sakupljen 2011. i 2012. godine (sezone A i B, Tabela 2), zatim postepeno sušen na vazduhu i u senci i uvan u tamnoj prostoriji na sobnoj temperaturi do po etka eksperimenata.



**Slika 13.** *Salvia amplexicaulis* Lam. (foto: A. Alimpi ).



**Slika 14.** *Salvia jurisicii* Košanin (foto: A. Alimpi ).



**Slika 15.** *Salvia ringens* Sibth. & Sm. (foto: A. Alimpi ).

**Tabela 2.** Podaci o sakupljenom biljnom materijalu istraživanih vrsta *Salvia*.

Vrsta	Lokalitet	Geografski podaci			Datum	Fenofaza	Broj vau era	Sezona*
		Geografska dužina (N)	Geografska širina (E)	Nadmorska visina (m)				
<i>Salvia amplexicaulis</i> <b>Lam.</b>	Pletvar, R. Makedonija	41°22,169''	21°39,180''	1010	12.07.2011.	kraj cvetanja	BEOU;16673	A
	Pletvar, R. Makedonija	41°22,169'	21°39,180''	1010	3.07.2012.	puno cvetanje	BEOU;17079	B
<i>Salvia jurisicii</i> <b>Košanin</b>	Štip, R. Makedonija	41°50,324'	22°08,289'	420	11.07.2011.	kraj cvetanja	BEOU;16674	A
	Štip, R. Makedonija	41°50,324'	22°08,289'	420	2.07.2012.	kraj cvetanja	BEOU;17078	B
<i>Salvia ringens</i> <b>Sibth. &amp; Sm.</b>	Put Leskovica- Pepelište, R. Makedonija	41°34,407'	22°13,501'	581	11.07.2011.	kraj cvetanja	BEOU;16671	A
	Krivolak, R. Makedonija	41°53,33'	21°41,08'	229	2.07.2012.	puno cvetanje	BEOU;16675	B

\*Sezona: A (2011. godina); B (2012. godina)



### 3.2. Hemikalije i reagensi

Metanol, etanol, destilovana voda, glacijalna sir etna kiselina, hlorovodoni na kiselina, heksan, dihlorometan, hloroform, etil acetat i formaldehid su nabavljeni od Zorka Pharma, Šabac (Srbija). Galna kiselina, kvercetin, askorbinska kiselina, 2(3)-t-butil-4-hidroksianizol (BHA), 3,5-di-tert-butil-4-hidroksitoluen (BHT), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2 -azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), kalijum-acetat ( $C_2H_3KO_2$ ), kalijum-persulfat ( $K_2S_2O_8$ ), dimetilsulfoksid (DMSO), anhidrovani natrijum-karbonat ( $Na_2CO_3$ ), aluminijum-nitrat nonahidrat ( $Al(NO_3)_3 \times 9H_2O$ ), natrijum-acetat ( $C_2H_3NaO_2$ ), gvož e(III)-hlorid ( $FeCl_3$ ), gvož e(II)-sulfat heptahidrat ( $FeSO_4 \times 7H_2O$ ), -karoten, Folin-Ciocalteu fenolni reagens, monobazni natrijum-fosfat ( $NaH_2PO_4$ ), dibazni natrijum-fosfat ( $Na_2HPO_4$ ), 5,5 -ditiobis (2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB), acetilholinesteraza izolovana iz *Electrophorus electricus* (electric eel) (AChE), acetilholin-jodid, galantamin-hidrobromid iz *Lycoris sp.*, koji na kiselina, tirozinaza izolovana iz gljiva, 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA), Tris (2-Amino-2-(hidroksimethyl)-1,3-propanediol) su kupljeni od Sigma Chemicals Co. (SAD), a Tween 40 i linolna kiselina od Acros Organics (Belgija). Standardi fenolnih komponenti (galna kiselina, kafena kiselina, ruzmarinska kiselina, apigenin, luteolin, genkvanin, kvercetin, kumarin) su nabavljeni od Merck (Nema ka).

### 3.3. Mikroskopske analize

#### 3.3.1. Mikromorfološka analiza biljnog materijala binokularnom lupom

Biljni organi prou avanih vrsta (listovi, stabla, ašica, krunica i orašice) su bez prethodne pripreme posmatrani i fotografisani binokularnom lupom Nikon SMZ18 na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Merenja dužine i širine orašica su obavljena pomo u softvera DIGIMIZER 4.3.4. Za potrebe posmatranja miksokarpije (osluznjavanja), orašice su postavljene na predmetno staklo, nakvašene destilovanom vodom, a zatim je posmatran intenzitet osluznjavanja pomo u binokularne lupe LEICA DMLS na Katedri za ekologiju Instituta za botaniku Biološkog fakulteta Univerziteta u

Beogradu. Reakcija osluznjavanja je posmatrana na svakih 15 minuta u toku prvog sata i narednih 8 sati u intervalima od 60 minuta. Ukoliko nakon toga nije bilo produkcije sluzi, smatrano je da nema reakcije osluznjavanja posmatranog uzorka.

### 3.3.2. Svetlosna mikroskopija

Za histološku i citološku analizu delovi listova ise eni uz glavni nerv i stabala su fiksirani FAA fiksativom (formalin, sir etna kiselina i alkohol), zatim dehidratirani serijom etanola rastu e koncentracije (10 - 100%) i kalupljeni u parafinske blokove. Preseci dobijeni se enjem blokova na rotacionom mikrotomu na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stankovi ” su deparafinisani i obojeni hematoksilinom, a zatim posmatrani i fotografisani na Zeiss Axiovert mikroskopu (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Nema ka).

### 3.3.3. Elektronska mikroskopija

#### 3.3.3.1. Skeniraju a elektronska mikroskopija (SEM)

Površina intaktnih orašica i ise aka drugih biljnih organa (liska, stablo, ašica, krunica) je analizirana skeniraju om elektronskom mikroskopijom. Uzorci biljnog materijala su montirani na nosa e pomo u dvostrano-lepljive trake i napareni slojem zlata u ure aju BALTEC SCD 005, sa vremenom naparavanja 100 sekundi i strujom naparavanja 30 mA, a zatim posmatrani i snimani skening elektronskim mikroskopom JEOL JSM 6390W na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

#### 3.3.3.2. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Ise ci biljnog materijala (stabla i listovi) površine oko 5 mm<sup>2</sup> su neposredno po prikupljanju fiksirani 3% rastvorom glutaraldehida u fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7.3), nakon ega je materijal ispran fosfatnim puferom i postfiksiran 1% rastvorom osmijum-tetroksida u istom puferu (24 h, 4 °C). Fiksirani materijal je ispran destilovanom vodom i

dehidratiran u etanolu rastu e koncentracije (30 - 100%), a zatim ukalupljen u smeši smola ARALDIT CY 212 i DDSA (Hardener) uz akcelerator BDMA (0,3%). Ukalupljeni biljni materijal je ise en uz pomo LKB III ultramikrotoma. Polutanki preseci (*semi-thin*) debljine 1 - 1,5  $\mu\text{m}$  su obojeni toluidin plavim, a zatim posmatrani i fotografisani svetlosnim mikroskopom Zeiss Axiovert (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Nema ka). Finiji preseci (oko 500 nm) su montirani na bakarne mrežice i kontrastirani uranil-acetatom i olovo-citratom za posmatranje MORGAGNI 268 transmisionim elektronskim mikroskopom (FEI Company, Eindhoven, Holandija) na 100 kV.

### 3.4. Izolovanje i analiza sastava etarskih ulja

**Izolovanje etarskih ulja.** Nadzemni delovi biljaka (po 100 g suvog biljnog materijala) su samleveni (3 - 6 mm), (biljni materijal ozna en šifrom B u Tabeli 2). Etarsko ulje je dobijeno hidrodestilacijom tokom 3 sata u aparaturi po *Clevenger*-u po proceduri IV Jugoslovenske farmakopeje (Yugoslav Pharmacopoeia IV, 1984).

**Analiza sastava etarskih ulja.** Kvalitativna i kvantitativna analiza etarskih ulja je izvršena pomo u gasne hromatografije (GC-FID) i masene spektrometrije (GC-MS). Koriš en je HP-5890 Series II gasni hromatograf (GC) opremljen S/SL (split-splitless) injektorom, HP-5 kapilarnom kolonom (25 m  $\times$  0.32 mm, debljina filma 0,52  $\mu\text{m}$ ) i plameno-jonizuju im detektorom (FID), dok je vodonik koriš en kao nose i gas (1 mL/min). Temperatura injektora je iznosila 250 °C, detektora 300 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu od 40° do 260 °C (°C/min).

Gotovo isti analiti ki uslovi su primenjeni i za GC-MS analizu, što je ra eno na HP G 1800C Series II GCD analiti kom sistemu, s tim što je koriš ena HP-5MS kolona (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ) i helijum kao nose i gas. Temperatura transfer linije (MSD) je iznosila 260 °C. EI maseni spektri (70 eV) su dobijeni u scan režimu u opsegu m/z 40 - 400. U svim slu ajevima, po 1  $\mu\text{L}$  etanolnog rastvora etarskog ulja (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) injektiran je u split režimu (1:30).

Identifikacija pojedina nih komponenti vršena je masenospektrometrijski i preko retencionih indeksa, uz koriš enje razli itih baza masenih spektara (NIST/Wiley), razli itih ina pretrage (PBM/NIST/AMDIS) i raspoloživih literaturnih podataka (Adams, 2001; Hochmuth, 2006). Za potrebe kvantifikacije kao osnova su uzeti procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovaraju ih hromatograma (FID, 250 °C).

### 3.5. Priprema ekstrakata

Biljni materijal prikupljen u sezonama A i B (Tabela 2) procesuiran je za ekstrakciju tako što je materijal podeljen u etiri grupe: kompletni nadzemni delovi biljaka, listovi, stabla, cvasti. Biljni materijal je usitnjen (2 - 6 mm) pomo u laboratorijskog blendera (Waring laboratory blender, No. 8010ES). Ekstrakcija je izvršena maceracijom uz koriš enje ultrazvu nog kupatila da bi se pove ala efikasnost ekstrakcije (Veli kovi i dr., 2007; Gliši i dr., 2011). Uvedene su dve paralelne procedure: individualna (jednostepena) i sukcesivna (trostepena) ekstrakcija.

**Individualna (jednostepena) ekstrakcija.** Odmereno je po 10 g samlevenog biljnog materijala, preliveno sa po 100 mL odgovaraju eg rastvara a (10% w/v). Biljni materijal je ekstrahovan 24 h u mraku na sobnoj temperaturi, s tim da je prvog i poslednjeg sata izložen delovanju ultrazvuka u ultrazvu nom kupatilu (30 °C, 2 h).

**Sukcesivna ekstrakcija (ekstrakcija u tri koraka).** Ovaj tip ekstrakcije obuhvata niz sukcesivnih ekstrakcija i filtracija koje se izvode na istom uzorku biljnog materijala kao što je opisano ranije ( enol i dr., 2012; Orhan i dr., 2007, 2012, 2013). Odmereno je 10 g samlevenog biljnog materijala, preliveno sa po 100 mL dihlormetana (10% w/v) prvog dana, sa 100 mL etil-acetata (10% w/v) drugog dana, a zatim sa 100 mL metanola (10% w/v) tre eg dana. Svaka pojedina na ekstrakcija je vršena u trajanju od 24 h u mraku na sobnoj temperaturi. Materijal za ekstrakciju je izlagan ultrazvuku u ultrazvu nom kupatilu (30 °C) prvog i poslednjeg sata ekstrakcije.

Nezavisno od procedure, biljni materijal je nakon završene ekstrakcije filtriran pomo u filter papira (Whatman No. 1), a rastvara je iz dobijenih filtrata uklonjen pomo u

rotacionog vakuuma uparivača (Buchi rotavapor R-114). Nakon uparavanja, dobijeni suvi ekstrakti su sušeni u frižideru na 4 °C do sledećih eksperimentata. Izmerena je masa suvog ekstrakta i izračunat prinos ekstrakcije na osnovu sledeće formule:

$$[(m_1 - m_0) / M] \times 100\%$$

gde  $m_0$  predstavlja masu prazne vijale,  $m_1$  masu vijale sa ekstraktom,  $(m_1 - m_0)$  predstavlja masu suvog ekstrakta, a  $M$  masu suvog biljnog materijala korišćenog za ekstrakciju.

### 3.6. HPLC analiza ekstrakata

Analiza fenolnih jedinjenja u ekstraktima izvršena je tehnikom hromatografijom pod visokim pritiskom (*High Performance Liquid Chromatography*), korišćenjem Agilent 1100 Series HPLC sistema i UV-DAD detektora (*UV-Diode Array Detector*), po originalnoj proceduri Veit i dr. (1995). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Agilent Eclipse XDB-C18 kolona (5 µm, 150 × 4,6 mm, 80 Å). Injektirano je 15 µL ekstrakata koncentracije 10 mg/mL, a hromatogrami su snimljeni na talasnoj dužini od 350 nm. Kao mobilna faza za hromatografsko razdvajanje korišćen je sistem rastvarača: (A) 0,15 % fosforna kiselina u smeši voda:metanol (77:23, pH=2) i (B) metanol, pri protoku od 1 cm<sup>3</sup>/min, temperaturi 15 °C i primenom sledećeg elucionog profila: izokratski 0 - 3,6 min 100 % A; 3,6 - 24 min 80,5 % A; 24 - 30 min izokratski; linearno 30 - 60 min 51,8 % A; 60 - 67,2 min 100 % B.

Fenolne komponente u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu, a kvantifikacija je izvršena korišćenjem kalibracionih krivih standarda. Glikozidi su izraženi kao ukupni glikozidi odgovarajućih aglikona. Identifikovane komponente su klasifikovane po Bolton i dr. (2008) i Neveu i dr. (2010).

### **3.7. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u ekstraktima**

Za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja korišćena je procedura po Singleton i Rossi (1965). U test epruvete je odmereno po 200 µL ekstrakta koncentracije 1 mg/mL, nakon čega je dodato po 1 mL 10% rastvora Folin–Ciocalteu reagensa. Nakon 6 minuta, u test epruvetu je dodat 7,5% rastvor rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (800 µL). Slepa proba je sadržala destilovanu vodu umesto uzorka. Za konstruisanje kalibracione krive korišćena je galna kiselina rastvorena u destilovanoj vodi u koncentracijama 0,01 - 0,1 mg/mL. Sva eksperimentalna merenja su izvršena u triplicatu. Apsorbanca je određivana na 740 nm nakon inkubacije u trajanju od 120 minuta na sobnoj temperaturi, pomoću JENWAY 6305UV/Vis spektrofotometra.

Ukupan sadržaj fenola u ekstraktima je izražen iz jednačine prave kalibracione krive za galnu kiselinu ( $y = 7,063x - 0,015$ ,  $R^2 = 0,999$ ) i izražen je u ekvivalentima galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg GAE/g). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

### **3.8. Određivanje sadržaja flavonoida u ekstraktima**

Za određivanje ukupnog sadržaja flavonoida je korišćena procedura po Park i dr. (1997). U test epruvete je odmereno po 0,5 mL uzorka koncentracije 1 mg/mL, zatim dodato 2,05 mL 80% etanola, 0,05 mL 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> × 9 H<sub>2</sub>O, i 0,05 mL 1M rastvora CH<sub>3</sub>COOK. Slepa proba je sadržala 96% etanol umesto uzorka. Za konstruisanje kalibracione krive je korišćen rastvor kvercetina u 96% etanolu u koncentracijama 0,01 - 0,1 mg/mL. Apsorbanca je određivana nakon 40 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi na 415 nm pomoću JENWAY 6305UV/Vis spektrofotometra.

Sadržaj flavonoida u ekstraktima je izražen iz jednačine kalibracione krive za kvercetin ( $y = 13,00x - 0,019$ ,  $R^2 = 0,999$ ) i izražen u ekvivalentima kvercetina po gramu suvog ekstrakta (mg QE/g). Sva eksperimentalna merenja su izvršena u triplicatu, a rezultati su prezentovani kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

### **3.9. Određivanje antioksidativne aktivnosti**

#### **3.9.1. DPPH test**

DPPH test se prati kolorimetrijski, promenom boje DPPH rastvora od tamno ljubiaste (DPPH radikal) do žute (redukovani DPPH) do koje dolazi u prisustvu antioksidanasa koji deluju kao donori elektrona i prevode DPPH radikal u hidrazin. Ovaj test izveden je prema proceduri koju je razvio Blois (1958) sa određenim modifikacijama.

Metanolni rastvor DPPH (40 µg/mL) je pripremljen neposredno pre eksperimenta. Stok razblaženja suvih ekstrakata pripremljeni su u metanolu u koncentraciji od 10 i 1 mg/mL (w/v). Ostala razblaženja su dobijena u finalnoj zapremini od 2000 µL reakcione smeše dobijene mešanjem potrebne zapremine stoka razblaženja ekstrakta sa radnim rastvorom DPPH. Metanol je korišćen kao blank, dok je metanol sa rastvorom DPPH korišćen kao slepa proba. BHA, BHT i askorbinska kiselina su korišćeni kao pozitivne kontrole (referentni antioksidansi ili standardi). Slepa proba, uzorci i standardi su pripremljeni u triplikatu. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanca na 517 nm pomoću spektrofotometra JENWAY 6305UV/Vis.

Inhibicija DPPH radikala u prisustvu testiranog uzorka je izražena unata po sledejoj formuli i izražena u procentima (%):

$$(A_{sp}-A_{uz})/(A_{sp}) \times 100\%$$

gde je  $A_{sp}$  apsorbanca slepe probe (bez uzorka) i  $A_{uz}$  je apsorbanca probe sa uzorkom različite koncentracije. DPPH aktivnost je izražena preko  $IC_{50}$  vrednost (µg/mL), koja predstavlja koncentraciju uzorka koja redukuje 50% početne koncentracije DPPH radikala, a izražena je na osnovu jedne krive apsorpcije koja se dobija kao grafički prikaz zavisnosti inhibicije (%) od koncentracije ekstrakta (µg/mL).

### 3.9.2. ABTS test

ABTS test je kolorimetrijski i zasnovan na obezbojavanju ABTS rastvora uzrokovanog prisustvom antioksidanasa. Antioksidansi deluju kao donori elektrona i prevode  $ABTS^+$  katjon (plavozelene boje) u neutralni, molekulski oblik koji je bezbojan. ABTS test je izveden prema proceduri Miller i dr. (1993) sa odre enim modifikacijama.

Stok rastvor  $ABTS^+$ radikala (7 mM) pripremljen je 12-16 sati pre po etka eksperimenta rastvaranjem ABTS u 2,46 mM rastvora kalijum-persulfata. Ovaj stok rastvor neposredno pre eksperimenata je razblažen destilovanom vodom da se dobije apsorbanca radnog rastvora  $0,700 \pm 0,020$  na 734 nm. U 50  $\mu$ L testiranog ekstrakta (1 mg/mL) ili rastvora standarda BHA i BHT (0,1 mg/mL) dodato je 2000  $\mu$ L radnog rastvora  $ABTS^+$  i inkubirano 30 minuta na 30 °C. Destilovana voda je koriš ena kao blank, dok je u slepu probu umesto uzorka dodato 50  $\mu$ L destilovane vode. Apsorbanca je merena na 734 nm pomo u JENWAY 6305UV/Vis spektrofotometra.

ABTS aktivnost uzoraka je izra unata pomo u kalibracione krive askorbinske kiseline (0 - 2 mg/L) ( $y = -0,215x + 0,640$ ,  $R^2 = 0,999$ ) i prezentovana kao mg ekvivalenata askorbinske kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg AAE/g). Uzorci i standardi su pripremljeni u triplikatu i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.9.3. FRAP test

FRAP (Ferric-Reducing Ability of Plasma) testom se procenjuje ukupni antioksidativni kapacitet uzorka na osnovu redukcije kompleksa feri tripiridiltriazin (Fe(III)-TPTZ) do fero tripiridiltriazin (Fe(II)-TPTZ) u prisustvu uzorka u uslovima niskog pH. FRAP test je izveden po standardnoj proceduri (Benzie i Strain, 1996) sa neznatnim modifikacijama.

FRAP reagens je pripremljen neposredno pre eksperimenta tako da sadrži natrijum acetatni pufer (300 mmol/L, pH 3,6), 10 mmol/L TPTZ u 40 mmol/L HCl i 20mmol/L



rastvor  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  u odnosu 10:1:1 (v/v/v) i pre upotrebe je ugrejan do 37 °C. 100  $\mu\text{L}$  test uzorka (koncentracije 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) je dodato u 3 mL radnog FRAP rastvora i apsorbancija je merena na 593 nm nakon 4 minuta pomoću u JENWAY 6305UV/Vis spektrofotometra. Destilovana voda je korišćena kao blank, dok je slepa proba umesto uzorka sadržala odgovarajuće i rastvarače u kome je uzorak rastvoren. Askorbinska kiselina, BHA i BHT u koncentraciji 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  su korišćene kao standardi.

Ista procedura je ponovljena za rastvor  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (200 - 1600  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) da bi se konstruisala kalibraciona kriva za Fe(II). FRAP vrednosti uzoraka su izražene unate pomoću standardne krive za Fe(II) ( $y = 0,872x$ ,  $R^2 = 0,998$ ), izražene su kao  $\mu\text{mol Fe(II)}/\text{g}$  suvog ekstrakta i prezentovane kao srednja vrednost iz tri merenja  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.9.4. $\beta$ -karoten/linolna kiselina test

Ovaj test se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju dekolizacije rastvora  $\beta$ -karotena u prisustvu produkata oksidacije linolne kiseline i izveden je po modifikovanoj proceduri (Dapkevicius i dr., 1998).

Emulzija je pripremljena rastvaranjem  $\beta$ -karotena (2 mg), linolne kiseline (50  $\mu\text{L}$ ) i Tween 40 (400 mg) u 2 mL hloroforma, nakon čega je hloroform uparen pomoću rotacionog vakuuma u parivača na 40 °C, a suvi ostatak rastvoren pomoću 20 ml destilovane vode. Ekstrakti i standardi BHA, BHT i askorbinska kiselina su rastvoreni u koncentraciji od 0,5 mg/mL (w/v). 150  $\mu\text{L}$  emulzije i 21  $\mu\text{L}$  uzorka (ekstrakata/standarda) je dodato u mikrotitracione ploče sa 96 bunara i a, dok je kontrola sadržala 96% etanol umesto uzorka.

Apsorbance su merene neposredno nakon dodavanja uzorka i reagensa ( $t=0$  min) na 490 nm korišćenjem TecanSunrise SN i XFluor4 softvera i nakon 2 h inkubacije ( $t=120$  min). Antioksidativna aktivnost uzorka je određena praćenjem inhibicije dekolizacije rastvora  $\beta$ -karotena i procenat inhibicije je izražunat korišćenjem sledeće jednačine:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_{120}-C_{120})/(C_0-C_{120})] \times 100$$

gde su  $A_{120}$  i  $C_{120}$  apsorbance merene u  $t=120$  minuta za uzorke, odnosno kontrolu, dok je  $C_0$  apsorbance kontrole u  $t=0$  minuta. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost iz tri ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.10. Određivanje antimikrobne aktivnosti

#### 3.10.1. Određivanje antibakterijske aktivnosti

U cilju određivanja antibakterijske aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata žalfija korišćene su sledeće bakterijske kulture:

- **pet Gram-pozitivnih bakterija:** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Micrococcus flavus* (ATCC 14452), *Sarcina lutea* (ATCC 10054) i *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313).
- **šest Gram-negativnih bakterija:** *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas tolaasii* (NCTC 387), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 14273).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) etarskog ulja i ekstrakta je određena modifikovanom mikrodilucionom metodom (Daouk i dr., 1995; Hanel i Raether, 1988). Serijska razblaženja stoka rastvora uzoraka u Muller–Hinton medijumu su pripremljena u mikrotitracionim pločama sa 96 bunara i a. Suspenzija bakterija je podešena na  $1,0 \times 10^5$  CFU/mL pomoću sterilnog fiziološkog rastvora. Referentni antibiotik streptomycin (1 mg/mL DMSO) je korišćen kao pozitivna kontrola osetljivosti testiranih bakterija. Mikrotitracione ploče su inkubirane na  $37\text{ }^\circ\text{C}$  tokom 48 h. Najniža koncentracija uzorka koja inhibira rast bakterija je definisana kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC).

### 3.10.2. Određivanje antifungalne aktivnosti

U cilju određivanja antifungalne aktivnosti eteričkih ulja i ekstrakata testiranih vrsta korišćene su sledeće vrste patogenih mikromiceta (humanih izolata):

- tri vrste roda *Candida*: *C. krusei* (Castell.) Berkhout (BEOFB 821m), *C. albicans* (C.P. Robin) Berkhout (BEOFB 811m), *C. parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice) (BEOFB 831m),
- tri vrste roda *Aspergillus*: *A. glaucus* (L.) Link (BEOFB 301m), *A. fumigatus* Fresen. (BEOFB 232m), *A. flavus* Link. (BEOFB 221m),
- jedna vrsta roda *Trichophyton*: *T. mentagrophytes* (C.P. Robin) Sabour. (BEOFB 1320m).

Kulture mikromiceta su čuvane na Saburo-dekstroznom agaru (SDA) na 4 °C u Mikoteci Katedre za algologiju, mikologiju i lihenologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (BEOFB).

Antifungalna aktivnost uzoraka je testirana pomoću mikrodilucione metode korišćenjem mikrotitracionih ploča sa 96 bunarica (Sarker i dr., 2007). Suspenzija mikromiceta je pripremljena spiranjem površine SDA sterilnim fiziološkim rastvorom (0,9%) sa 0,1% Tween 20 (v/v). Zamućenost je određena spektrofotometrijski na 530 nm i broj jedinica je podešen na 10<sup>6</sup> CFU/mL (NCCLS, 1998). Stock rastvori su pripremljeni rastvaranjem uzoraka u 5% DMSO. U mikrotitracionim pločama su pripremljena dvostruka razblaženja stock rastvora uzoraka (64 - 0,25 mg/mL za ekstrakte i 4 - 0,125 mg/mL za eteričko ulje) u Sabouraudovom medijumu, nakon čega je dodata suspenzija mikromiceta. Negativna kontrola je sadržala sve komponente sem ekstrakta, dok je kao pozitivna kontrola uveden komercijalni antimikotik ketokonazol umesto ekstrakta. Nakon isteka prvih 24 h oksido-redukcioni indikator rezazurin je dodat u sve bunarice. Mikrotitracione ploče su inkubirane još 48 h na 37 °C, nakon čega su rezultati određivani pomoću binokularne lupe.

Najniža koncentracija uzorka koja inhibira rast mikromiceta definisana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Najniža koncentracija uzorka koja inhibira

rast mikromiceta nakon reinokulacije na SDA je definisana kao minimalna fungicidna koncentracija (MFC).

### 3.11. Određivanje citotoksičnosti i aktivnosti

Za testiranje citotoksičnosti i aktivnosti uzoraka korišćene su dve ćelijske linije humanog kolorektalnog karcinoma (HCT-116 i SW480) i ćelijska linija humane mijeloidne leukemije (K562). Korišćena su dva eksperimentalna dizajna bazirana na primeni MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijumbromid) boje. Ovim kolorimetrijskim testom se detektuje konverzija žute tetrazolijum soli u ljubičasto obojeni formazan koja je katalizovana ćelijskim enzimima i njen stepen predstavlja meru vijabilnosti ćelija.

**Eksperimentalni dizajn I:** MTT test je izveden prema Mosmann (1985). Ćelijske linije humanog kolorektalnog karcinoma (HCT-116 i SW480), dobijene od ATCC (*American Type Culture Collection*), su uzgajane u DMEM dopunjenom sa 10% FBS-a (*fetal bovine serum*), 100 µg/mL penicilina i 100 µg/mL of streptomicina. Ćelije su kultivisane u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> na 37 °C. Uzgajane su u boćicama za kulture od 75 cm<sup>2</sup> sa 15 mL DMEM, odakle su nakon nekoliko pasażiranja zasejane u mikrotitracione ploče sa 96 bunar i a (10<sup>4</sup> ćelija po bunar i u). Nakon inkubacije od 24 h, medijum je zamenjen sa 100 µL medijuma sa različitim koncentracijama uzorka (1 - 500 µg/mL). Netretirane ćelije su korišćene kao kontrola. Rastvor MTT boje (finalna koncentracija 5 mg/mL u PBS) je dodat u svaki bunar i , nakon čega su ploče inkubirane 2 - 4 h na 37 °C u 5% CO<sub>2</sub>. Obojeni kristali formazana su rastvoreni sa 150 µL DMSO. Apsorbanca je merena na 570 nm na 10 minuta u mikrotitracionih pločama (ELISA 2100 C) nakon 24 i 72 h. Proliferacija ćelija je izražavana kao odnos apsorbance tretirane grupe podeljen sa apsorbancom kontrolne grupe pomnožen sa 100 da bi se dobio procenat proliferacije.

**Eksperimentalni dizajn II:** MTT test je izveden prema Drakulić i dr. (2012) korišćenjem ćelijske linije K562 (imortalizovana linija hronične mijeloidne leukemije - CML, tip eritroleukemije), koja je izvedena iz CML pacijenata u blasnoj krizi. K562 ćelije su uzgajane u esencijalnom minimalnom medijumu (MEM) dopunjenom sa 10% FCS-a.

K562 elije u MEM su tretirane u mikrotitracionim plo ama razblaženjima testiranih ekstrakata (finalna razblaženja 50 - 400 µg/mL). Mikrotitracione plo e su inkubirane 48 h na 37°C. Nakon dodavanja rastvora MTT boje (0,5 mg/mL), plo e su dodatno inkubirane 3 h (37 °C), nakon ega je kiseli izopropanol dodat da bi rastvorio tetrazolijum so. Apsorbanca je merena na 620 nm.

### 3.12. Odre ivanje antineurodegenerativne aktivnosti

#### 3.12.1. Test inhibicije acetilholinesteraze (AChE)

Aktivnost uzoraka u inhibiciji acetilholinesteraze je merena spektrofotometrijski na osnovu procedure Ellman i dr. (1961), koriš enjem mikrotitracione plo e sa 96 bunar i a kako je opisano ranije (Orhan i dr., 2007, 2013; enol i dr., 2010) sa pojedinim modifikacijama. Hidroliza acetilholin-jodida je pra ena formiranjem žute boje 5-tio-2-nitrobenzoatnog anjona koji nastaje kao produkt reakcije DTNB sa tiholinima u prisustvu AChE (Orhan i dr., 2013).

Reakciona smeša (S) je pripremljena dodavanjem 140 µL natrijum-fosfatnog pufera (0,1 M, pH 7), 20 µL DTNB, 20 µL of rastvora uzorka u puferu koji sadrži 5% DMSO (koncentracije 25, 50 i 100 µg/mL) i 20 µL rastvora AChE (5 u/mL) u Tris-HCl puferu (20 mM, pH 7,5). Smeša bez uzorka je koriš ena kao kontrola (C), a galantamin, komercijalni antiholinesterazni lek alkaloidnog tipa, je uveden kao pozitivna kontrola.

Nakon inkubacije (15 min, 25 °C), reakcija je inicirana dodavanjem 10 µL acetilholin-jodida i apsorbanca je o itana pomo u ita a mikrotitracionih plo a Tecan Sunrise SN opremljenim XFluor4 softverom na talasnoj dužini od 412 nm. Procenat inhibicije AChE je izra unat na osnovu formule:

$$[C-S]/C \times 100\%,$$

gde je C - apsorbanca kontrole (ne sadrži uzorak) i S - apsorbanca tretmana (sa uzorkom).

### 3.12.2. Test inhibicije tirozinaze

Aktivnost tirozinaze se prati modifikovanom dopahrom metodom, koriste i L-DOPA kao supstrat (Masuda i dr., 2005; Orhan i dr., 2012). U ovom radu, aktivnost uzoraka u inhibiciji tirozinaze je merena spektrofotometrijski u mikrotitracionim ploama sa 96 bunara i na osnovu procedure Masuda i dr. (2005) sa nekim modifikacijama.

Uzorci i koji na kiselina su rastvoreni u natrijum-fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7,0) koji sadrži 5% DMSO, odnosno u natrijum-fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7,0) u koncentracijama 25, 50 i 100 µg/mL. Bunari i mikrotitracionih ploa su dizajnirani kao A: 120 µL natrijum-fosfatnog pufera i 40 µL rastvora tirozinaze u istom puferu (46 units/L), B: 160 µL pufera, C: 80 µL pufera, 40 µL rastvora tirozinaze (46 units/L) i 40 µL uzorka, D: 120 µL pufera i 40 µL uzorka.

Nakon dodavanja 40 µL rastvora L-DOPA u puferu i inkubacije (30 min, 25 °C), apsorbanca je izmerena pomoću mikrotitracionih ploa Tecan Sunrise SN opremljenim XFluor4 softverom na talasnoj dužini od 475 nm. Procenat inhibicije tirozinaze je izraunat na osnovu formule:

$$[(A-B)-(C-D)/(A-B)] \times 100\%.$$

### 3.13. Statistička analiza

Sva eksperimentalna merenja su izvedena u triplikatu i prezentovana kao srednja vrednost iz tri merenja ± standardna devijacija. Pirsonovi koeficijenti korelacije (*r*) (*Pearson's correlation coefficients*) su izraunati između ukupnog i individualnog sadržaja fenolnih komponenti sa jedne i rezultata antioksidativnih testova sa druge strane, a zatim interpretirani prema Taylor (1990). Sva izraunavanja i konstruisanje grafika u ovom radu su izvedena pomoću Microsoft Office Excell (2007).

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

### **4.1. Mikromorfološke, anatomske i citološke karakteristike prou avanih vrsta**

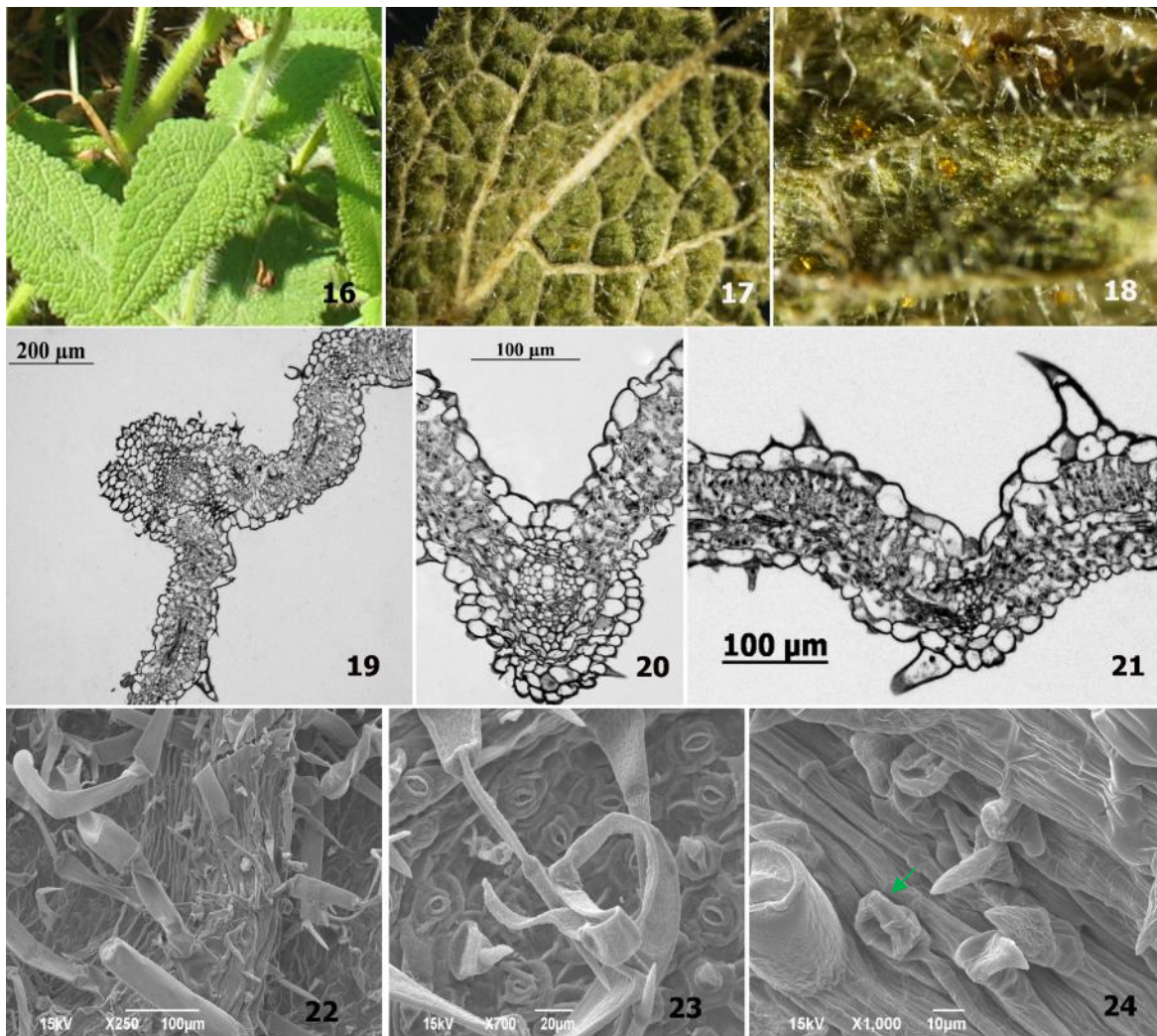
Morfološke karakteristike biljnih organa posmatranih vrsta su analizirane binokularnom lupom i skeniraju im elektronskim mikroskopom. Na biljnim organima analiziranih vrsta su uočene trihome, opisana je njihova struktura i distribucija, a zatim su njihove citološke karakteristike proučene pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa.

#### 4.1.1. Mikromorfološke, anatomske i citološke karakteristike *Salvia amplexicaulis*

Listovi *S. amplexicaulis* su prosti, u gornjem delu stabla sedeći, srcastom osnovom obavijaju stablo. Vrh liske je tupo zašiljen, a obod tupo i plitko nazubljen. Na licu su svetlozeleni, grubo naborani i naizgled goli. Glavni nerv je dobro uočljiv (Slika 16). Na abaksijalnoj strani lamine su prisutne dugačke, beli aste, više elijske neglandularne trihome i peltatne trihome žućkaste boje (Slika 17-18).

Epidermis je izgrađena od tesno spojenih ovalnih do pravougaonih elija, sa uočljivom kutikulom. Elijice epidermisa na licu lista su znatno krupnije u odnosu na epidermis na listu. Stome su prisutne na obe strane lista u nivou epidermisa, ali su znatno brojnije na listu i paracitnog su tipa. Fotosintetičko tkivo je predstavljeno sa 1 - 2 sloja palisadnog i 2 - 3 sloja sunđerastog tkiva. Glavni nerv je ispunjen višeslojnim parenhimskim tkivom u kome su uronjeni krupni, zatvoreni kolateralni provodni snopi i (Slike 19-21, 27-28, 31-32). Na abaksijalnoj strani se oko provodnih snopova nalazi kolenhimska sara, dok su u nivou glavnog nerva ka licu lista uočljiva i malobrojna sklerenhimska vlakna (Slika 19).

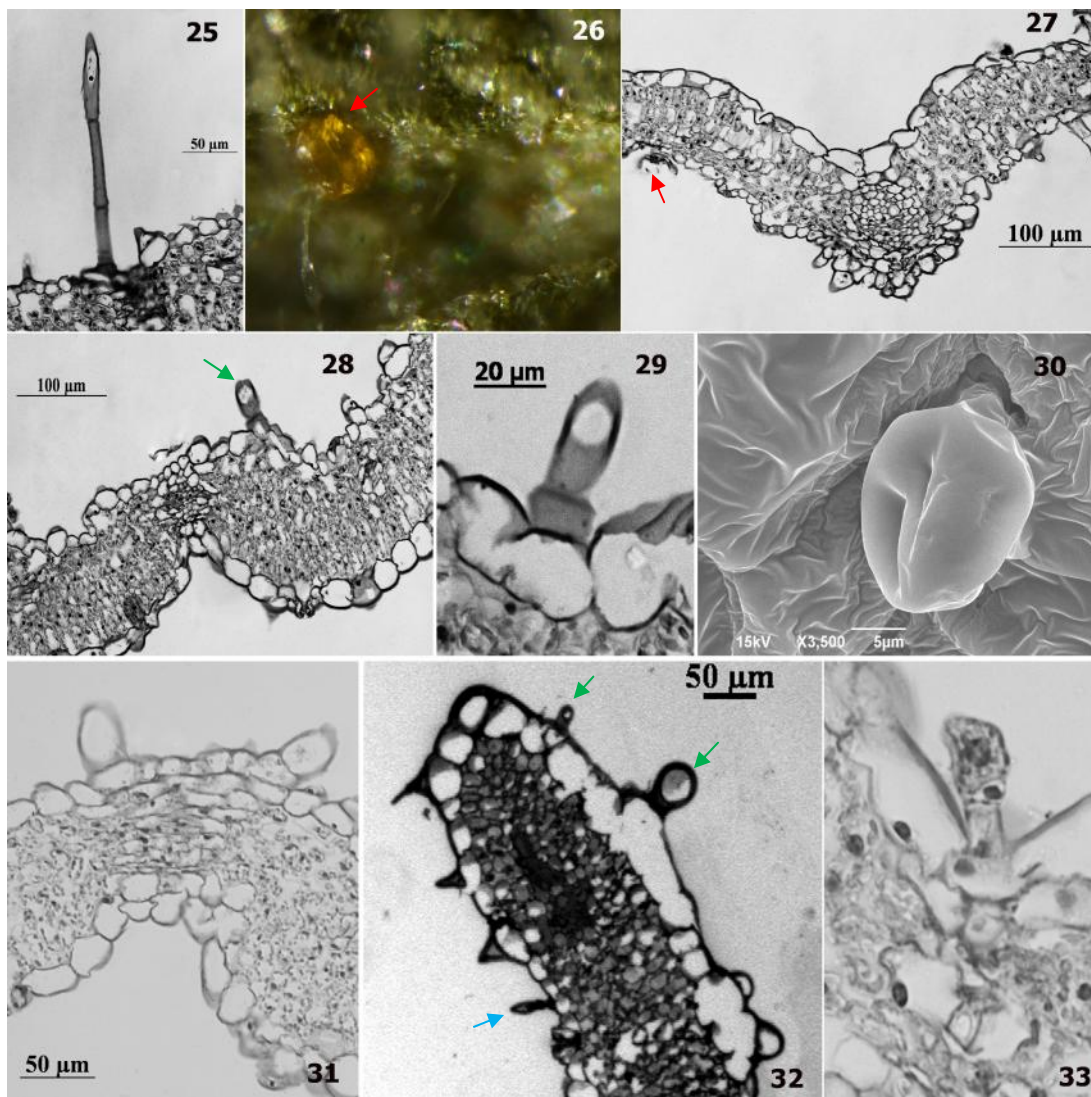
Na listovima *S. amplexicaulis* su uočene neglandularne (mehaničke) i glandularne trihome (žlezdane dlake). Neglandularne trihome su jedno elijske (često trouglaste) (Slike 21-24), dvo elijske (rogolike) (Slike 19, 21), tro elijske (Slika 25) ili više elijske (dugačke, izvijane, varijabilne dužine) (Slike 22-23). Neglandularne trihome često na površini nose papilozna zadebljanja.



Slike 16-24. List *S. amplexicaulis*:

16. Izgled lica lista; 17-18. Nali je lista (binokularna lupa): 20 x. (17.), 60 x (18.); 19-21. Popre ni presek lista (SM) sa uo ljuvim neglandularnim trihomama na licu i nali ju lista; 22-24. SEM mikrografije koje prikazuju nali je lista sa mnoštvom neglandularnih trihoma i kapitatom trihomom tipa I ( ).





Slike 25-33. Trihome na listovima *S. amplexicaulis*:

**25.** Neglandularna trihoma (SM); **26-27.** Peltatne trihome: **26.** Izgled pod binokularnom lupom u sekretornoj fazi (270 x) ( ); **27.** Popre ni presek lista sa peltatnom trihomom na nali ju u postsekretornoj fazi ( ) (SM); **28-33.** Kapitatne trihome tipa I: **28-29.** Popre ni presek lista sa kapitatnom trihomom tipa I (podtip I) na nali ju lista ( ) (SM); **30.** Kapitatna trihoma podtipa I na epidermisu nali ja lista (SEM); **31-32.** Popre ni presek lista sa kapitatnim trihomama podtipa I na nali ju lista (**31**) i licu lista (**32**) ( ) i podtipa III ( ) na nali ju lista (**32**); **33.** Kapitatna trihoma podtipa II na nali ju lista (SM).

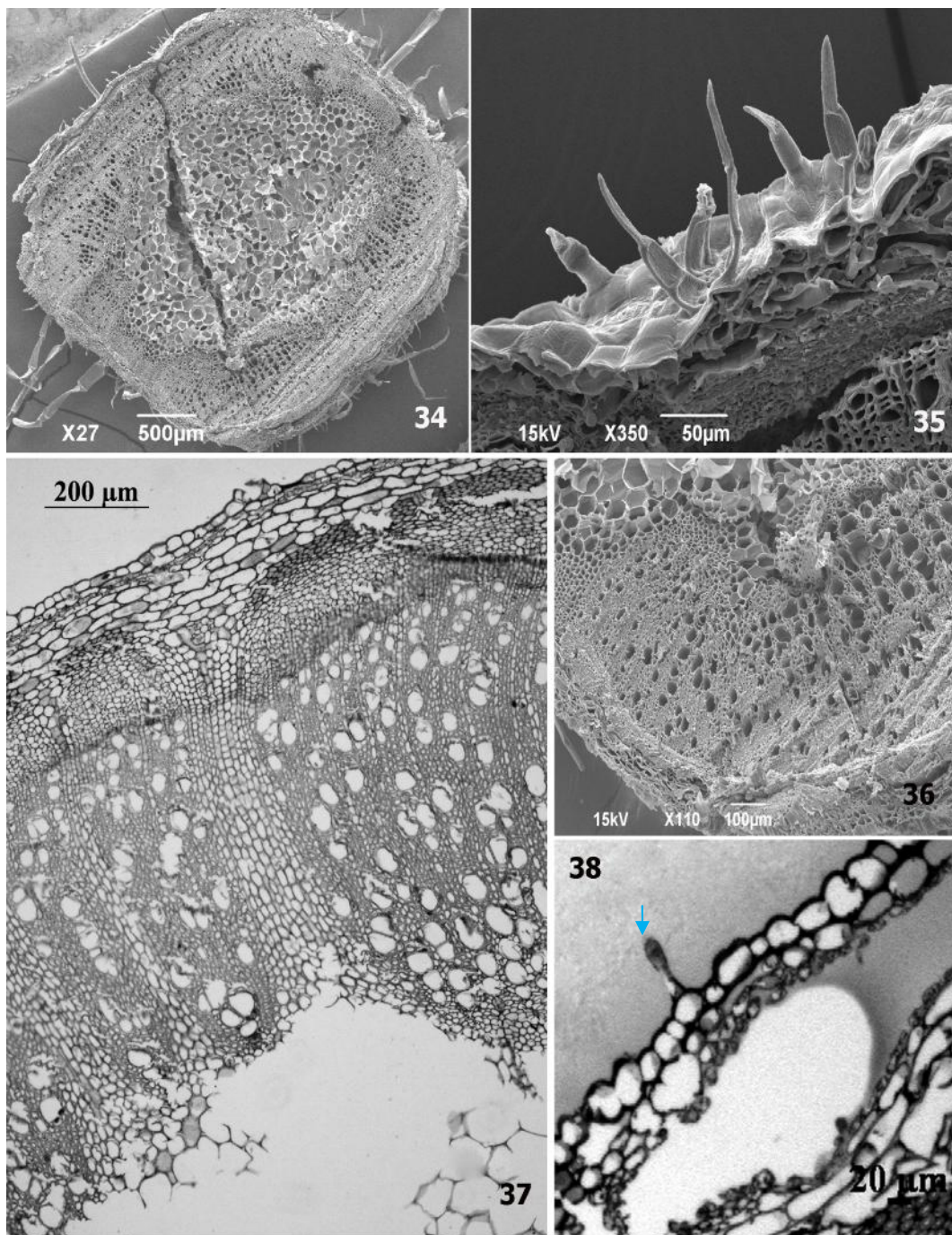
Glandularne trihome su predstavljene peltatnim i kapitatnim trihomama. Kapitatne trihome su prisutne sa obe strane lamine, dok su peltatne bile prisutne samo na abaksijalnoj strani.

**Peltatne trihome** sme e-žu kaste boje se uo avaju binokularnom lupom na nali ju lista (Slika 18, 26), kao i na preseku lista (Slika 27).

Uo en je **tip I kapitatnih trihoma** („niske“ kapitatne trihome) sa tri razli ita morfološka podtipa. *Podtip I* je gra en od ovalne jedno elijske glavice, široke i niske elije drške (koja može biti u potpunosti odsutna) i bazalne elije (Slika 24, 28-32). *Podtip II* se sastoji iz jedno elijske glavice, kratke i široke vratne elije, kratke drške i bazalne elije (Slika 33). *Podtip III* poseduje ovalnu jedno elijsku glavicu i izduženu eliju drške koja se proširuje idu i ka bazalnoj eliji (Slika 32). Na stablu je uo lživ samo podtip III kapitatnih trihoma (Slika 38).

Stablo *S. amplexicaulis* je zelene boje (Slika 16) i gusto pokriveno belim astim trihomama (Slika 16, 34-35). Krupnija stabla su etvorougaona na popre nom preseku (Slika 34), dok su grane uglavnom okrugle. Na površini stabla je jednoslojni epidermis sa kutikulom i brojnim belim, mehanim trihomama varijabilne dužine (Slike 34-35). Korteks je gra en od 5-8 slojeva parenhimskih elija i nekoliko slojeva kolenhima distribuiranog samo na uglovima stabla.

Prstenovi floema i ksilema su dobro razvijeni, dok je kambijalna zona slabo uo ljiva. Iznad floema su smeštena ostrvca sklerenhimskih vlakana (Slika 37). Ksilemski elementi predstavljeni su brojnim, krupnim trahejama i znatno sitnijim traheidima (Slike 36-37). Uo ena su dva tipa sržnih zraka: jednoslojni i višeslojni (do 12 slojeva elija izduženih u radijalnom pravcu) koji se protežu od korteksa do srži. U samom centru stabla je reksigena šupljina sa ostacima raskinutog parenhima centralnog cilindra (srž) (Slika 37). Stabla nose samo podtip III kapitatnih trihoma (Slika 38).



Slike 34-38. Stablo *S. amplexicaulis*:

34-36. Izgled popre no prese enog stabla (SEM); 37. Popre ni presekok stabla (SM); 38. Periferni deo popre nog preseka stabla sa kapitatnom trihomom podtipa III (SM) ( ).

ašica je dvousnata, deljena na zupce koji su u gornjem delu crvenkasto obojeni i sa jasno izraženom nervaturom (Slika 39). Obrasla je beli astim trihomama (Slike 39-40), a uo ljive su i žu kasto obojene peltatne trihome (Slika 40-41), krupnije od onih na listovima (Slika 41).



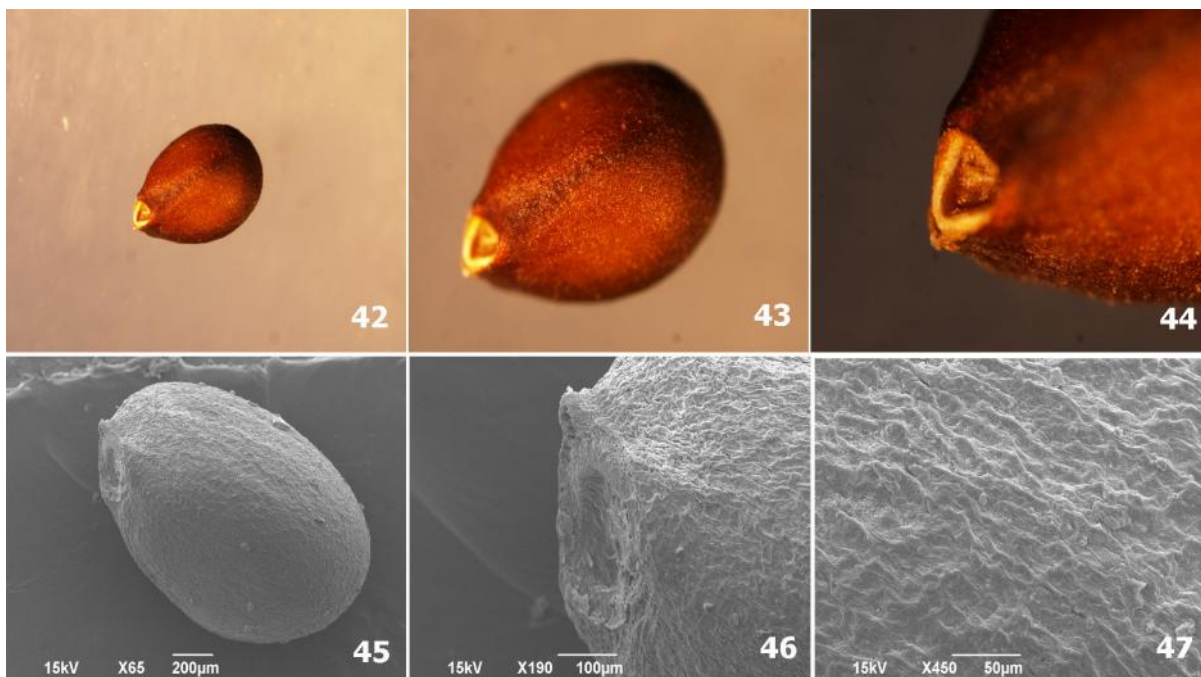
**Slike 39-41.** ašica *S. amplexicaulis* (binokularna lupa):

**39.** Izgled ašice (10 x), **40.** Izgled ašice (70 x); **41.** Peltatna trihoma na ašici (130 x) ( ).

Orašice *S. amplexicaulis* (N=10) su duga ke  $1,97 \pm 0,07$  mm i široke  $1,05 \pm 0,09$  mm, sa srednjim odnosom dužina/širina 1,88. Orašice su sme e boje, prolatno-sferi ne (Slike 42-43). Ventralna strana orašice je manje-više ravna, sa jasno uo ljivim ventralnim šavom (Slike 42-43), a dorzalna blago ispup ena (Slika 45).

Vršni deo orašice je zaobljen, dok je bazalni deo sužen, sa trouglastim stopalnim ožiljkom postavljenim ka ventralnoj strani orašice (Slike 42-46). Površina orašica je hrapava (Slike 43-45), sa jasno uo ljivim brdolikim uzvišenjima (retikularna ornamentacija) (Slike 46-47).

Orašice su produkovale žu kastu, transparentnu sluz bez fibrila 15 minuta nakon kvašenja, a debljina sluznog sloja je bila ve a od 0,5 mm (Slika 48).



Slike 42-47. Orašice *S. amplexicaulis*:

42-43. (binokularna lupa): 42. (25 x), 43. (50 x), 44. (100 x); 45-47. (SEM mikrografije): 45. Izgled orašice; 46. Izgled bazalnog dela orašice i stopalnog ožiljka; 47. Površinska ornamentacija orašice.



Slika 48. Miksokarpija orašice *S. amplexicaulis*.

### 4.1.2. Mikromorfološke, anatomske i citološke karakteristike *Salvia jurisicii*

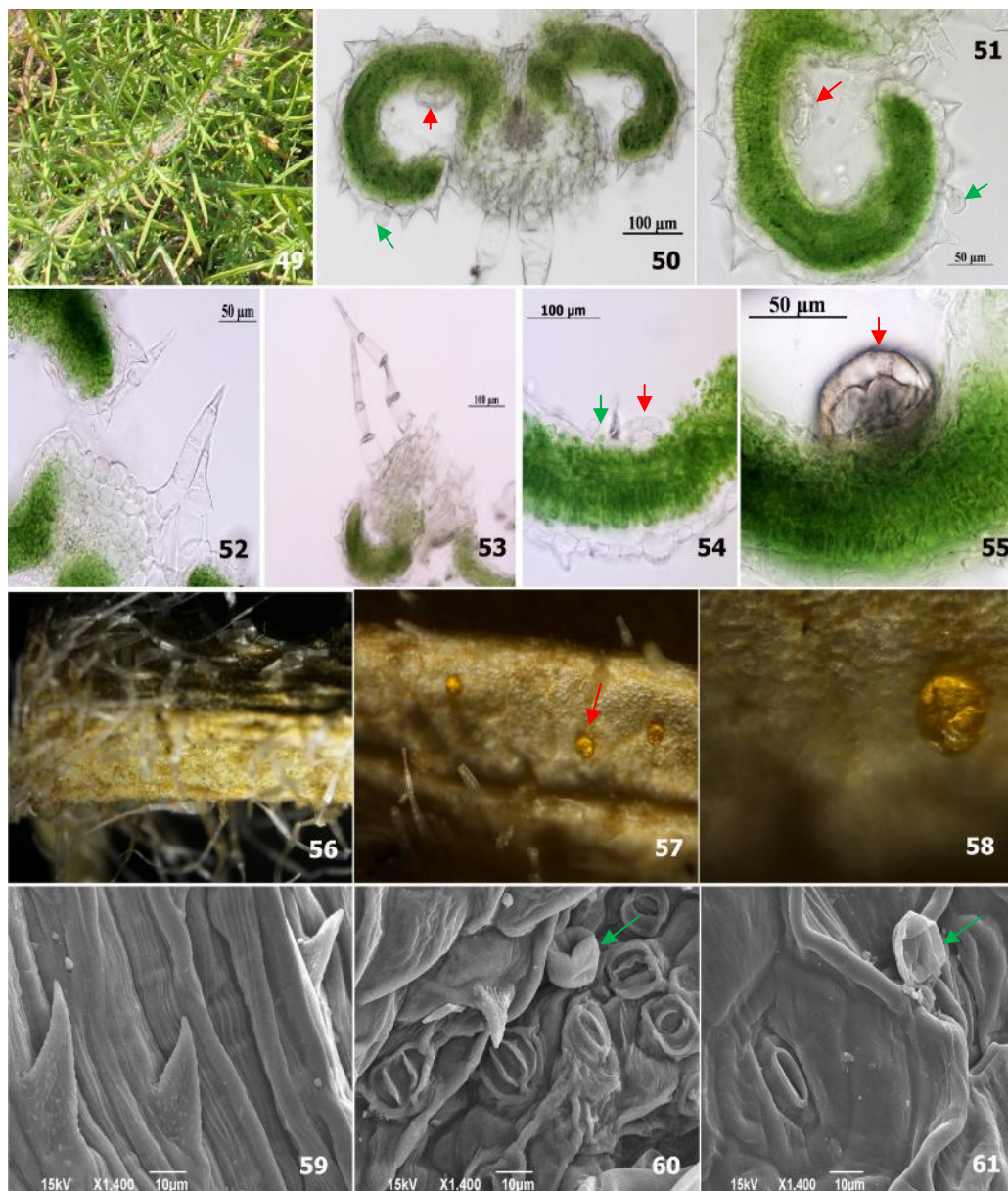
Listovi *S. jurisicii* su intenzivno zelene boje i perasto deljeni na nekoliko uzanih linearnih segmenata (Slika 49). Glavni nerv je veoma dobro izražen (Slika 50). Mehani ke trihome su prisutne sa obe strane lamine (Slike 50-53) i na lisnoj dršci (Slike 56-57). Neglandularne trihome su morfološki veoma raznovrsne, jedno elijske su trouglaste i papilozne (Slike 50-51, 59-60), dok su više elijske gra ene naj eš e od 4 - 6 elija ija se širina smanjuje idu i od baze ka vrhu trihome (Slika 52-53).

elije epidermisa lica su višestruko krupnije u odnosu na epidermis nali ja. Epidermis lica je bez stoma i prekriven debelim slojem glatke kutikule. Stome su paracitnog tipa i uo ene su samo na nali ju lista (Slika 60). Palisadno tkivo gradi 1 - 2 sloja krupnih i tesno zbijenih elija. Sun erasto tkivo (3 - 4 sloja) sadrži krupne intercelulare (Slike 62-68). U glavnom nervu je prisutan jedan zatvoreni kolateralni provodni snopi okružen parenhimskom sarom od 3 - 5 slojeva krupnih elija, u kojoj su javljaju ostrvca od sklerenhimskih vlakana ka adaksijalnoj strani (Slika 64-66), dok kolenhim na prikazanim presecima nije uo en. Na listovima su bile prisutne peltatne, kapitatne i digitiformne trihome.

**Peltatne trihome** žu kasto-sme e boje su bile uo ljlive na lisnoj dršci (Slike 57-58). Sastojale su se od bazalne elije u epidermisu, kratke elije drške i sekretorne glavice sastavljene iz 8 elija raspore enih u jednom krugu (Slike 50-51, 54-55, 67-69).

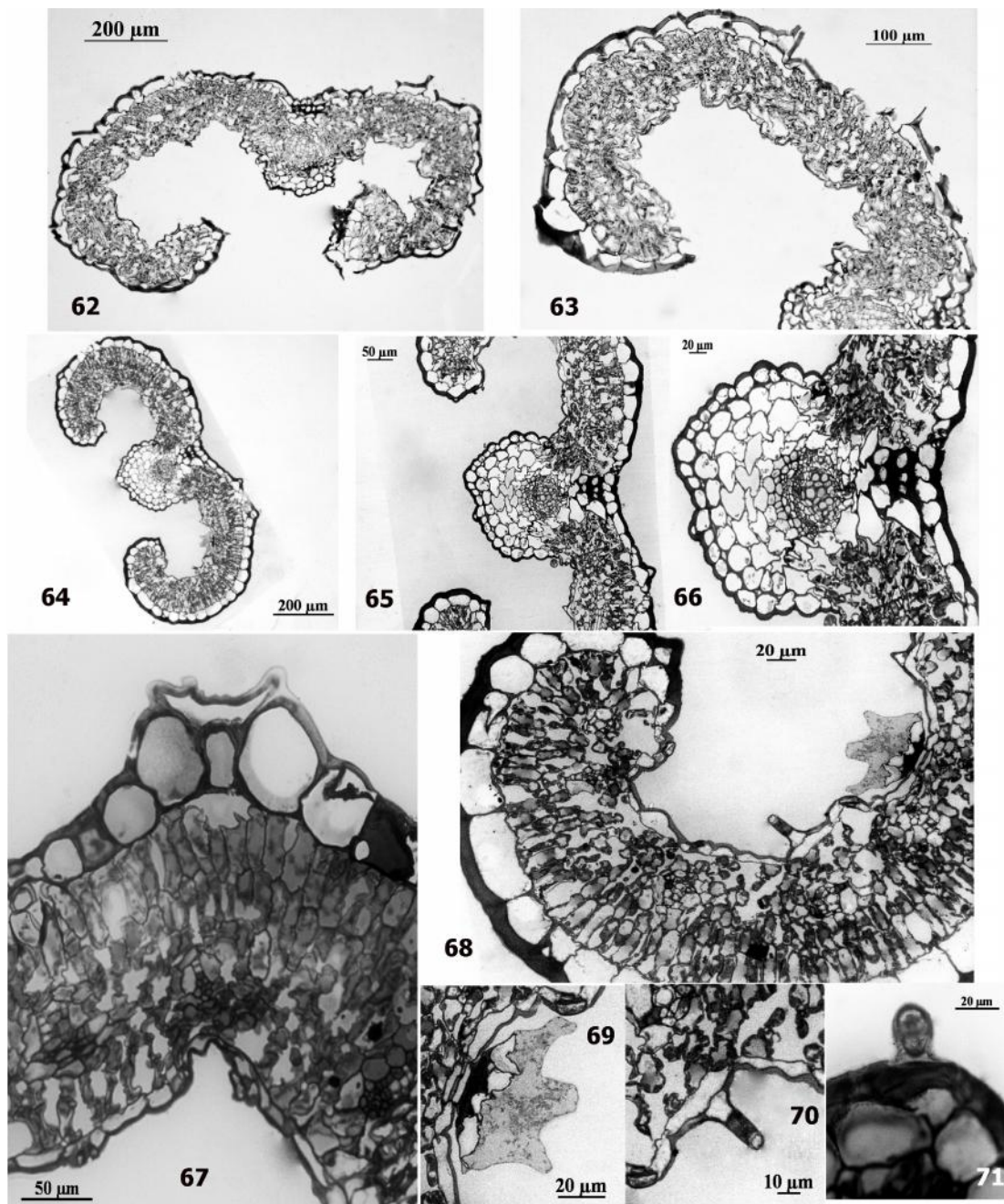
**Kapitatne trihome** su svrstane u **tip I** („niske“ kapitatne trihome), sa okruglom jedno elijskom glavicom, kratkom jedno elijskom drškom (bez vratne elije) i bazalnom elijom (Slike 50-51, 54, 71). elija glavice je bila veoma kutinizirana (Slika 71).

**Digitiformne trihome** su se sastojale od niske i izdužene bazalne elije u epidermisu, dve elije drške i jedne apikalne elije (Slike 68, 70). elije drške i apikalna elija su bile približno iste širine, bez jasnog prelaza me u njima (Slike 70, 72-73). Ove elije imaju debele elijske zidove, izuzev onog izme u apikalne elije i najviše elije drške (Slike 72-73). Apikalna elija je zaobljena (Slike 72-73), sa slabo razvijenim subkutikularnim prostorom (Slika 74). elije drške i bazalna elija u presektretornoj fazi poseduju veoma gustu citolazmu i malobrojne, relativno sitne vakuole (Slika 73-74).



Slike 49-61. Listovi *S. juriscii*:

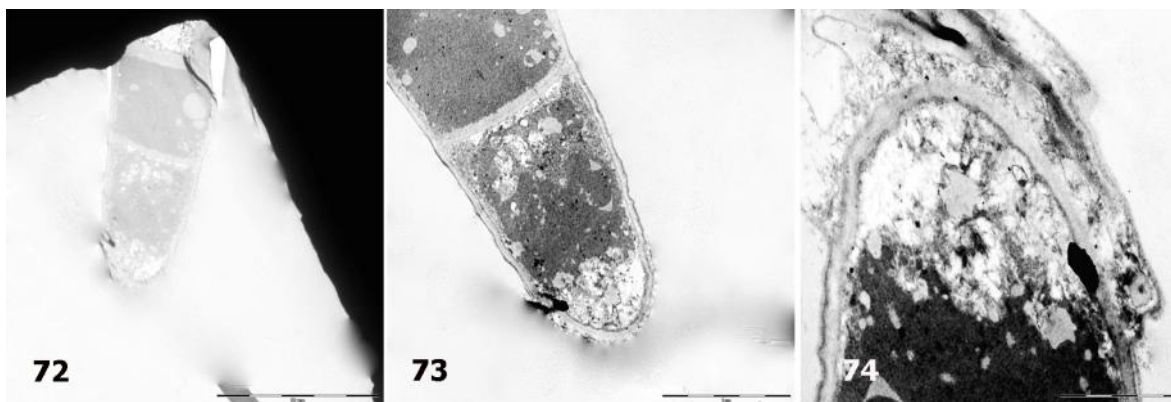
**49.** Izgled listova; **50-55.** Poprečni preseki lista *in vivo*; **50-51.** Listovi nose peltatne ( ) i kapitatne trihome tipa I ( ); **52-53.** Neglandularne trihome na listovima; **54-55.** Peltatne trihome na nali ju lista; **56-58.** Izgled lisne drške (binokularna lupa) sa neglandularnim i peltatnim trihomama ( ): **56.** (30 x), **57.** (70 x), **58.** (270 x); **59-61.** SEM mikrografije nali ja listova na kojima se uo avaju neglandularne (**59-60**) i kapitane trihome tipa I (**60-61**) ( ).



Slike 62-71. Struktura listova i trihome na listovima *S. jurisicii*:

62-66. Popre ni preseci listova (SM); 67-69. Peltatne trihome na listovima (SM): 67. Peltatna trihoma na licu lista u postsekretornoj fazi, 68. Peltatna i digitiformna trihoma na nali ju lista, 69. Peltatna trihoma ma nali ju lista; 70. Digitiformna trihoma; 71. Kapitratna trihoma tipa I.



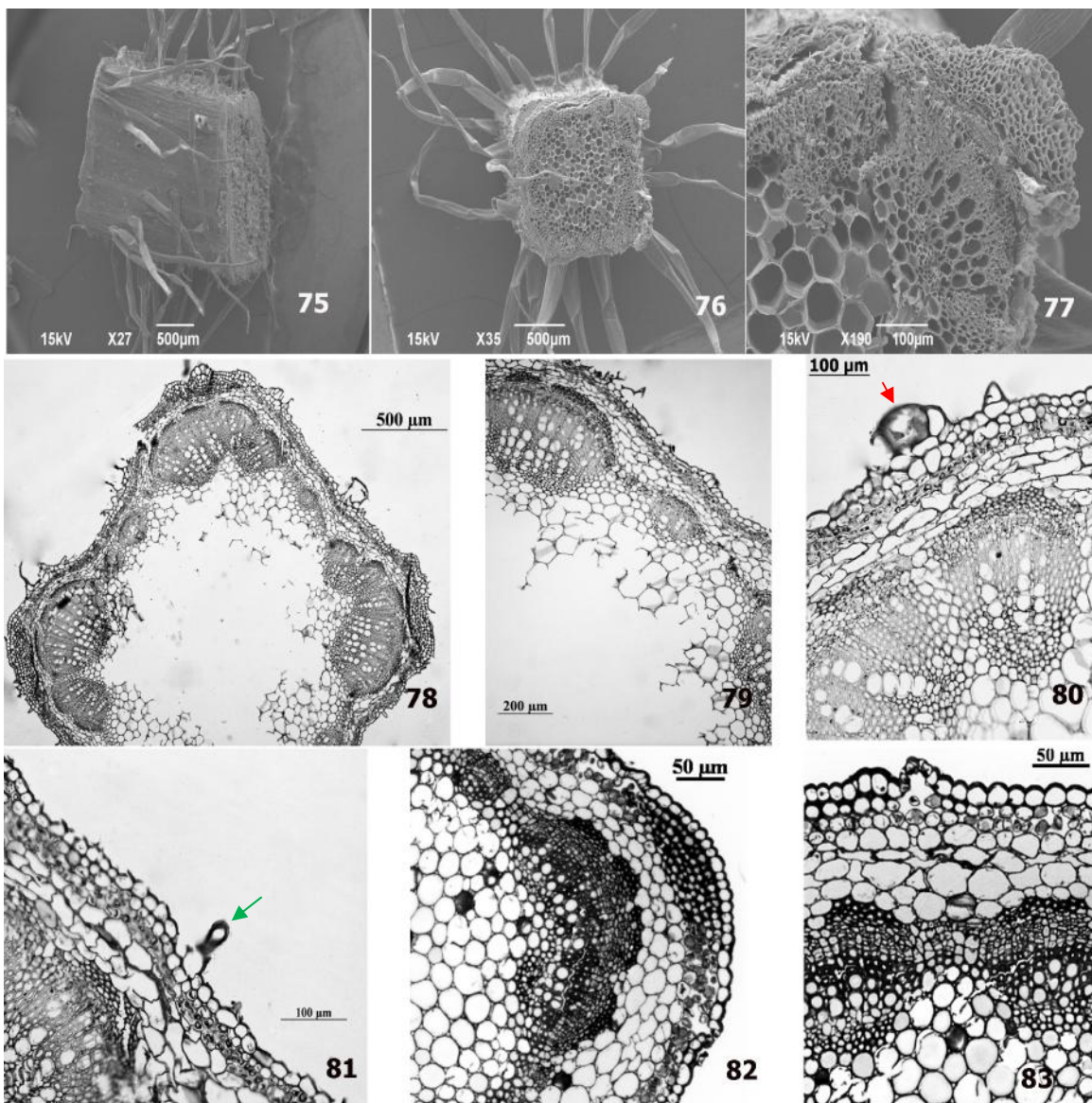


**Slike 72-74.** TEM mikrografija koja prikazuje izgled i gra u digitiformnih trihoma na listovima *S. jurisicii*.

Stablo *S. jurisicii* je tipično četverostrano i na poprečnom preseku četvorouglasto, obraslo dugačkim belim trihomama (Slike 75-76, 78). Na površini stabla je jednoslojna epidermis sa kutikulom (Slike 79-83). Korteks je građen od 2 - 3 subepidermalno postavljene slojeva kolenhima (5 - 10 slojeva na uglovima stabla) i 3 - 4 slojeva parenhima primarne kore. Iznad floema se uočavaju ostrvca sklerenhimskih ćelija. Ksilem je dobro razvijen, građen od krupnih traheja i sitnijih traheida, ispresecan jednoslojnim sržnim zracima koji se protežu od kambijalne zone do srži (Slike 79-81).

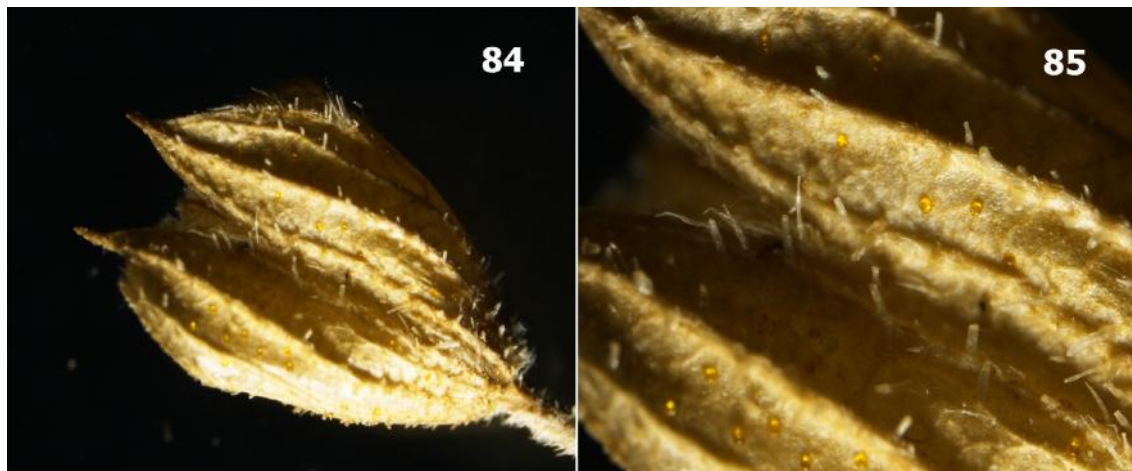
Kambijum je uglavnom slaboučljiv, i samo na nekim mestima vidljiv kao 2 - 3 slojeva ćelija naslaganih u radijalnom pravcu (Slika 82). Sem više ćelijskih neglandularnih trihoma, na stablu su uočljive peltatne (Slika 80) i kapitatne trihome tipa I (Slika 81).

Čašica *S. jurisicii* je dvousnata i deljena na zupce, sa jasno uočljivim nervima (Slika 84). Na površini nosi brojne dugačke, bele aste neglandularne trihome i peltatne trihome žućkaste boje uglavnom raspoređene izmeću nerava (Slike 84-85).



Slike 75-83. Stablo *S. juriscii*:

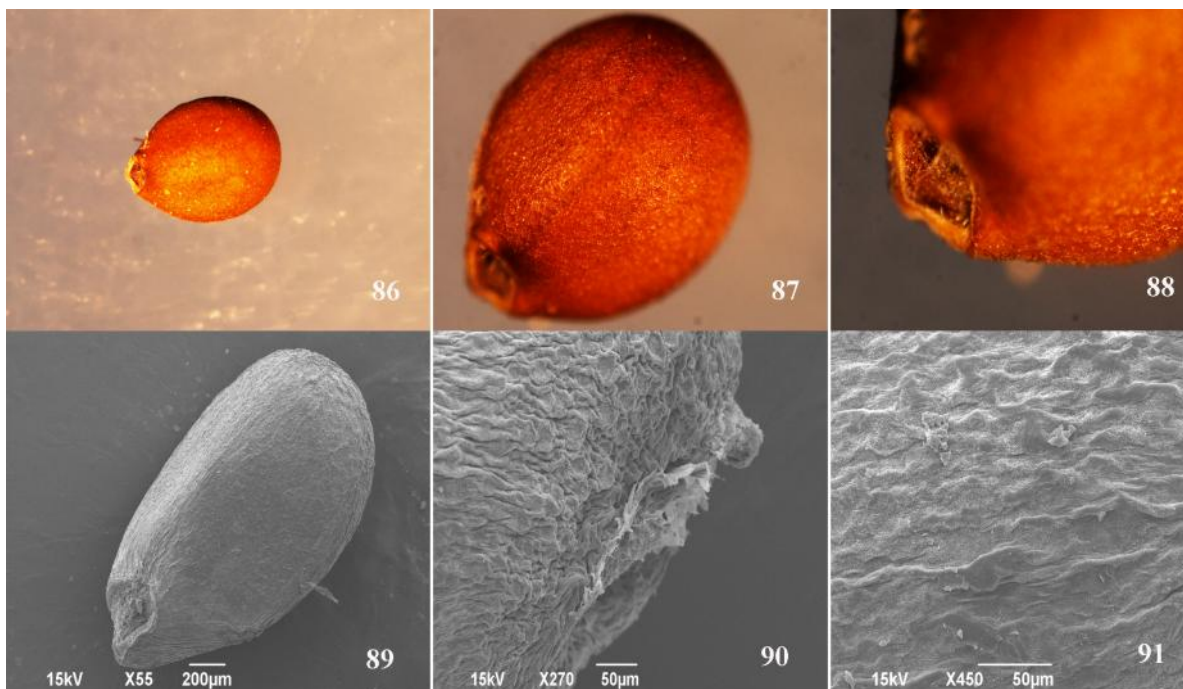
75-77. SEM mikrografije stabla: 75. Spoljašnji izgled stabla, 76. Izgled popre no prese enog stabla, 77. Detalj popre no prese enog stabla; 78-83. Popre ni preseci stabla (SM), gde se uo avaju peltatne (80) ( ) i kapitatne trihome tipa I (81) ( ).



**Slike 84-85.** ašica *S. jurisicii* (binokularna lupa): **84.** (15 x) i **85.** (30 x).

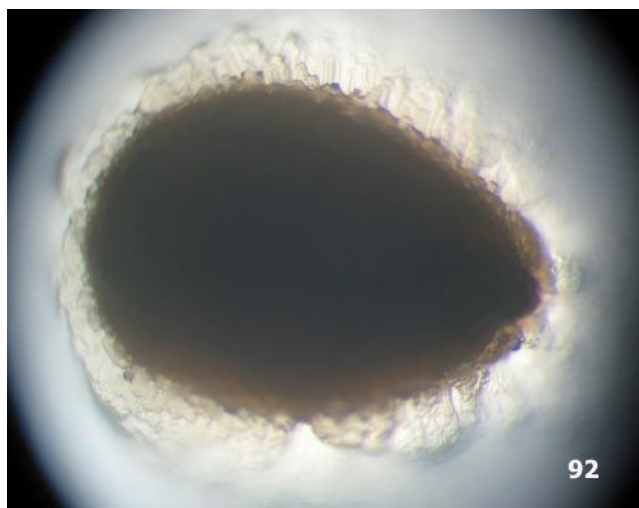
Orašice *S. jurisicii* su smeđe, pri vrhu široko zaobljene i tupo sužene ka bazi. Trbušna strana je blago ispupčena, a trbušni šav slabije uoljiv (Slike 86-87). Dužina orašica (N=10) je  $2,34 \pm 0,15$  cm, a širina  $1,61 \pm 0,15$  cm. Odnos dužina/širina je 1,45, a oblik je sferičan do eliptičan. Stopalni ožiljak je manje-više okrugao, pomeren ka ventralnoj strani (Slike 87-90).

Površina orašica ornamentisana finim talasastim naborima - retikularna ornamentacija koja postaje izražajnije u pravcu bazalnog ožiljka (Slike 90-91). Kod ove vrste je bila prisutna miksokarpija; 15 minuta nakon kvašenja orašice su produkovale žu kustu, transparentnu sluz bez fibrilacija je debljina bila veća od 0,5 mm (Slika 92).



**Slike 86-91.** Orašice *S. jurisicii*:

**86-88.** (binokularna lupa): **86.** (25 x), **87.** (50 x), **88.** (100 x); **89-91.** SEM mikrografije orašice: **89.** Izgled orašice, **90.** Izgled bazalnog dela i stopalnog ožiljka orašice, **91.** Površinska ornamentacija orašice.



**Slika 92.** Miksokarpija orašice *S. jurisicii*.

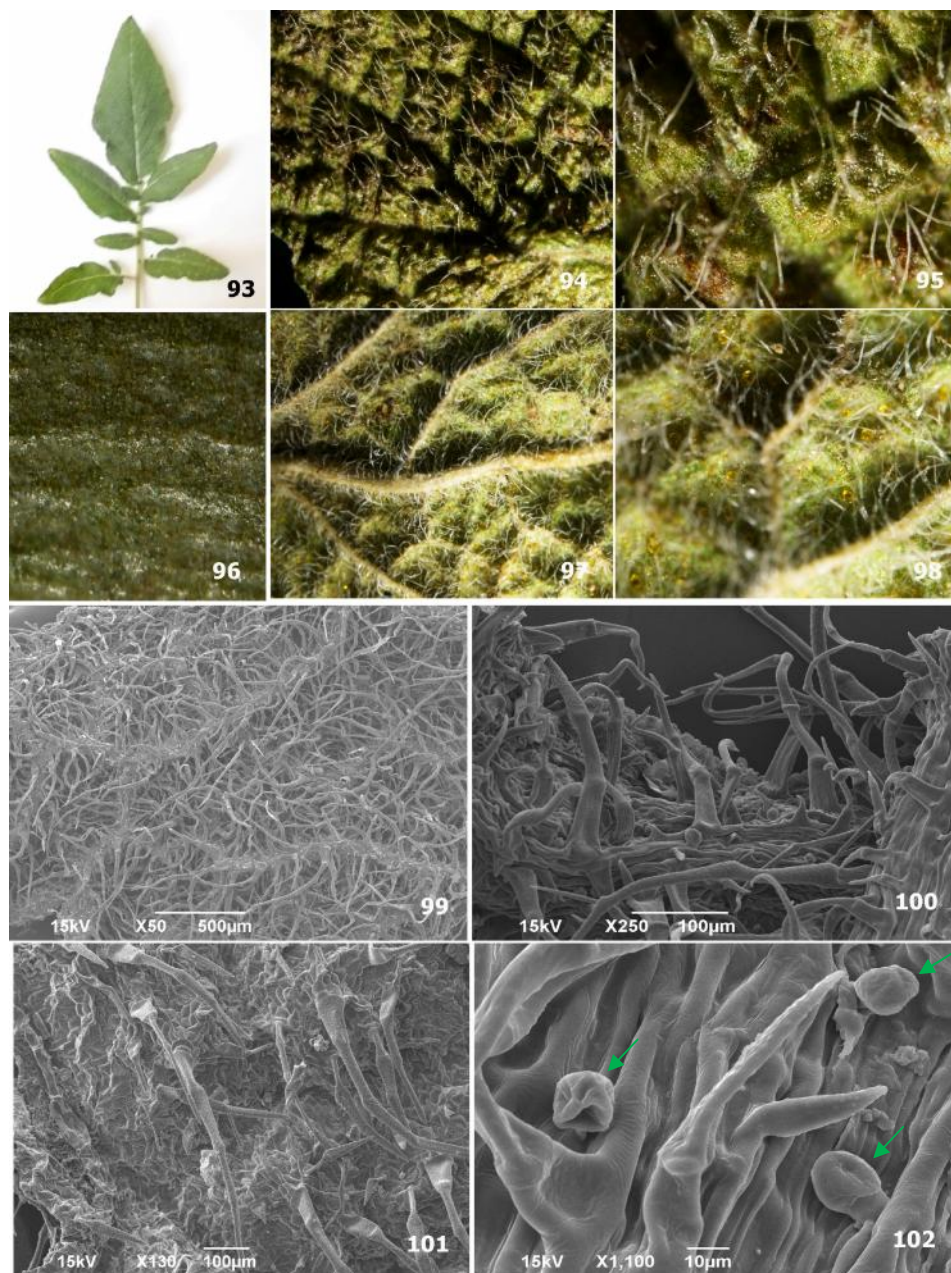
### 4.1.3. Mikromorfološke, anatomske i citološke karakteristike *Salvia ringens*

Listovi *S. ringens* su krupni, nepravilno duboko perasto deljeni na veliki terminalni režanj i nekoliko pari bo nih sitnijih reznjeva (Slika 93). Lamina je obrasla gustim, belim astim mehani kim trihomama sa obe strane, a posebno na nali ju (Slike 94-95, 97-98). Nervatura lista je perasta i veoma jasno izražena sa abaksijalne strane (Slika 98). Lisna drška ne nosi trihome (Slika 96).

elije epidermisa sa adaksijalne strane su pravougaonog oblika, tesno me usobno spojene i pokrivenne debelom kutikulom. Stome su paracitne i prisutne samo na nali ju lista. Epidermske elije abaksijalne strane su sitnije, loptaste, sa razvijenim slojem kutikule, posebno u nivou glavnog nerva (Slike 103-105). Palisadno tkivo je predstavljeno sa 4 - 5 slojeva izduženih elija bogatih hloroplastima, ija se veli ina smanjuje idu i ka nali ju. Sun erasto tkivo je rastresito i predstavljeno sa 1 - 2 sloja loptastih elija smeštenih uz epidermis nali ja (Slike 103-106). Glavni nerv je obavijen višesojnom sarom gra enom od parenhimskih, malobrojnih kolenhimskih elementata ka abaksijalnoj i nekoliko sklerenhimskih elija smaštenih u useku na adaksijalnoj strani lamine (Slike 104-106). Provodni snopi i su kolateralni i zatvoreni, sa dobro razvijenim provodnim elementima (Slika 105). Na listovima su uo ljive raznovrsne neglandularne trihome: jedno elijske (trouglaste) (Slike 103, 106), dvo elijske (sa proširenim donjom i zašiljenom vršnom elijom) (Slike 103, 106-107) i duga ke više elijske (Slike 99-102). Od žlezdanih trihoma su prisutne peltatne (Slike 126-128) i kapitatne trihome tipa I na nali ju lista (Slike 102, 106, 129-131).

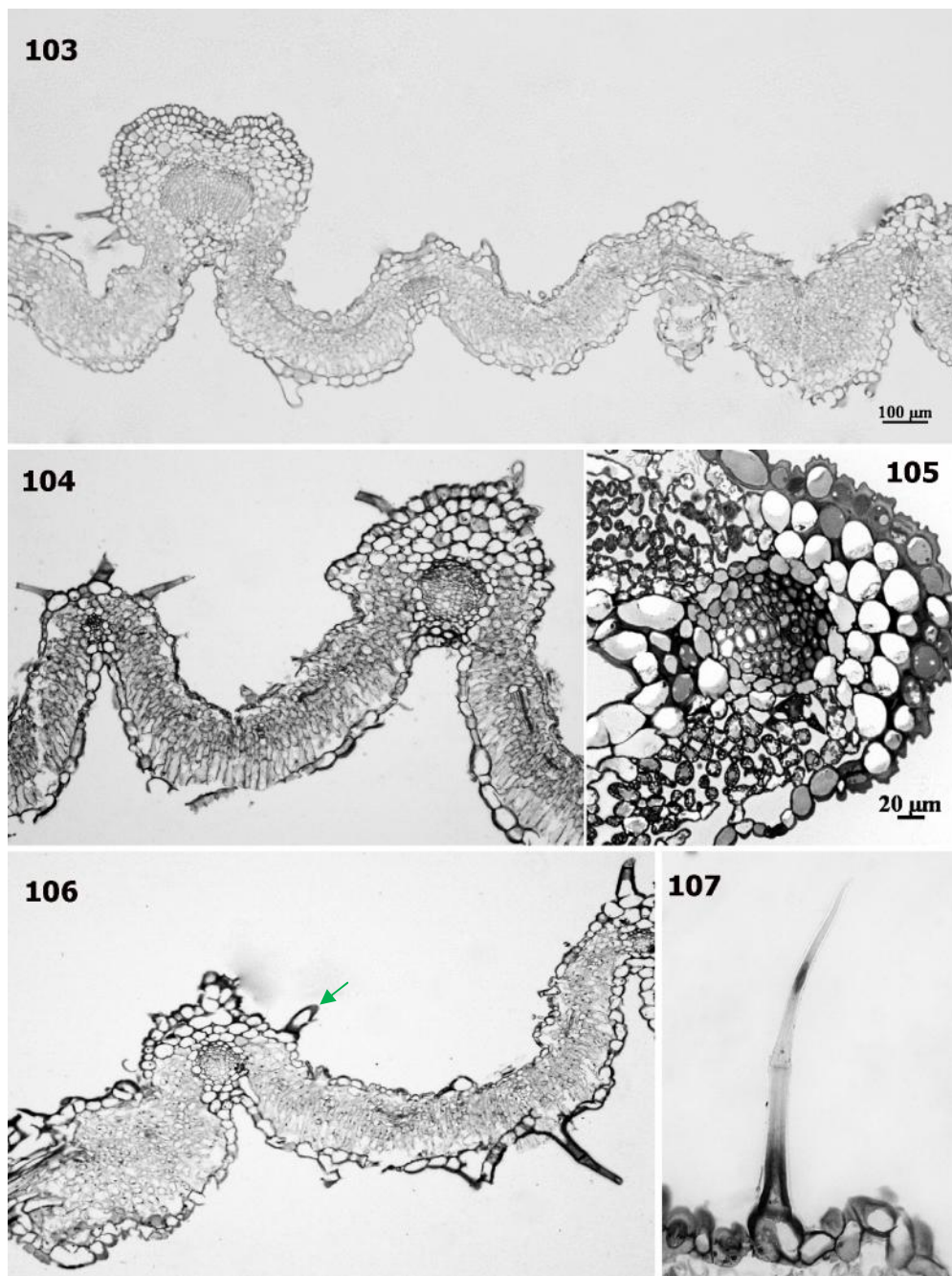
Stablo *S. ringens* je okruglo i kružnog oblika na popre nom preseku (Slika 108) i na površini glatko, bez trihoma (Slika 109). Na površini je jednoslojni epidermis sa razvijenom kutikulom, gra en od elija pravougaonog ili kružnog oblika na popre nom preseku. Subepidermalno, korteks zapo inje sa 10-ak slojeva uglastog kolenhima na koje se nadovezuje do 5 slojeva parenhimskog tkiva. Prstenovi užeg floema i šireg ksilema su kontinuirani, a kambijum izme u njih je slabo uo ljiv. Iznad floema su razvijeni malobrojni sklerenhimski elementi. Ksilem je predstavljen mnogobrojnim uskim, debelozidnim traheidima i manje brojnim trahejama širokog lumena (Slike 110-113). Parenhim je u

centralnom delu stabla raskinut i gradi centralnu reksigenu šupljinu, odnosno srž (Slika 108, 110-111).



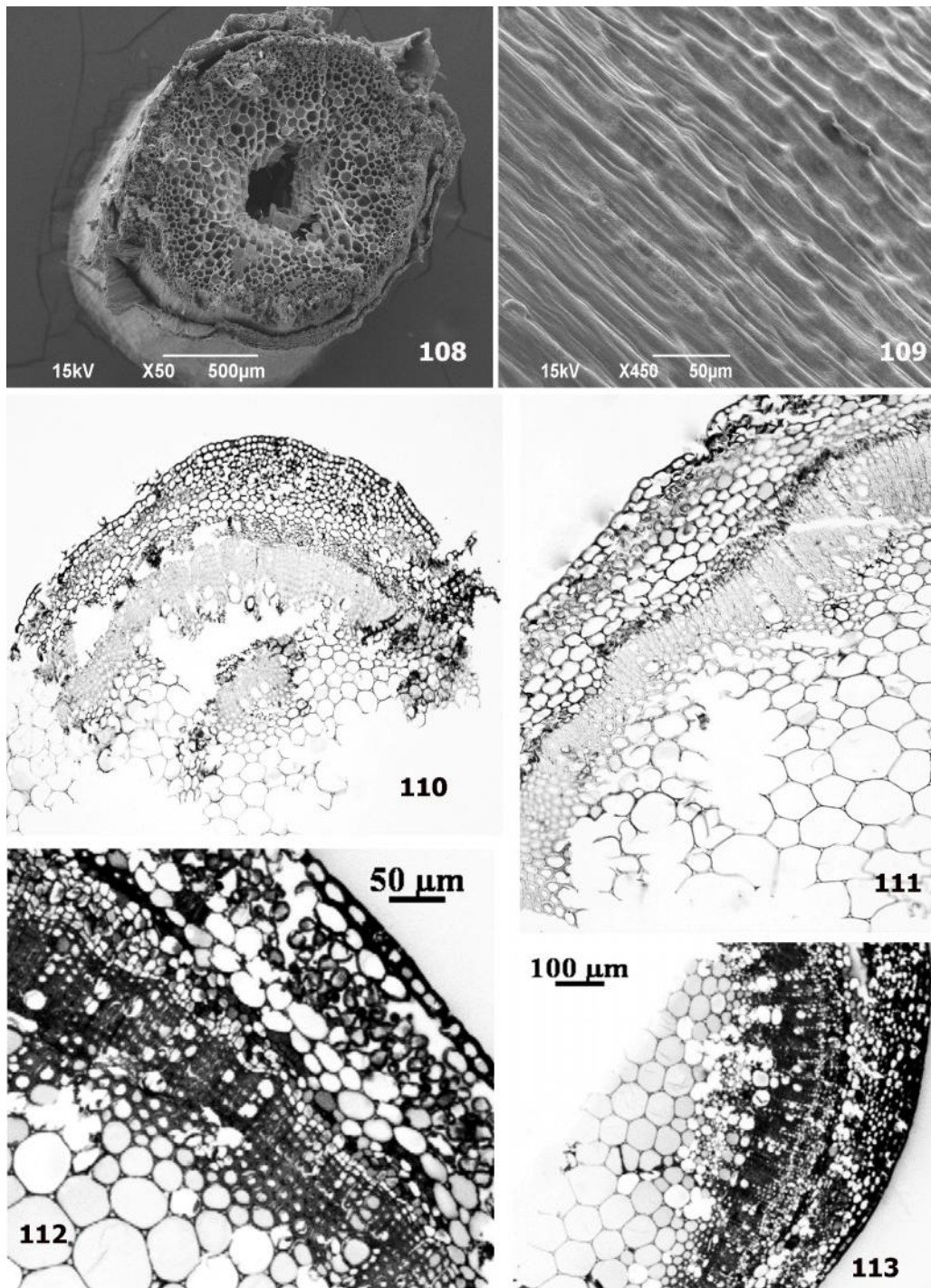
**Slike 93-102.** Listovi *S. ringens*:

**93.** Izgled lista; **94-98.** (binokularna lupa): **94-95.** Lice lista: **94.** (20 x), **95.** (50 x); **96.** Lisna drška (120 x); **97-98.** Nali je lista: **97.** (20 x), **98.** (50 x); **99-102.** SEM mikrografije nali je lista sa mnogobrojnim neglandularnim i kapitatnim trihomama tipa I ( ).



Slike 103-107. Struktura listova *S. ringens*:

103-106. Popre ni preseci listova (SM) koji pokazuju strukturu i prisustvo razli itih neglandularnih (Slike 103-104, 106-107) i tipa I kapitatnih trihoma (Slika 106) ( ).



Slike 108-113. Stablo *S. ringens*:

108-109. SEM mikrografije popre no prese enog stabla (108) i površine stabla (109); 110-113. Popre ni preseci stabla (SM).

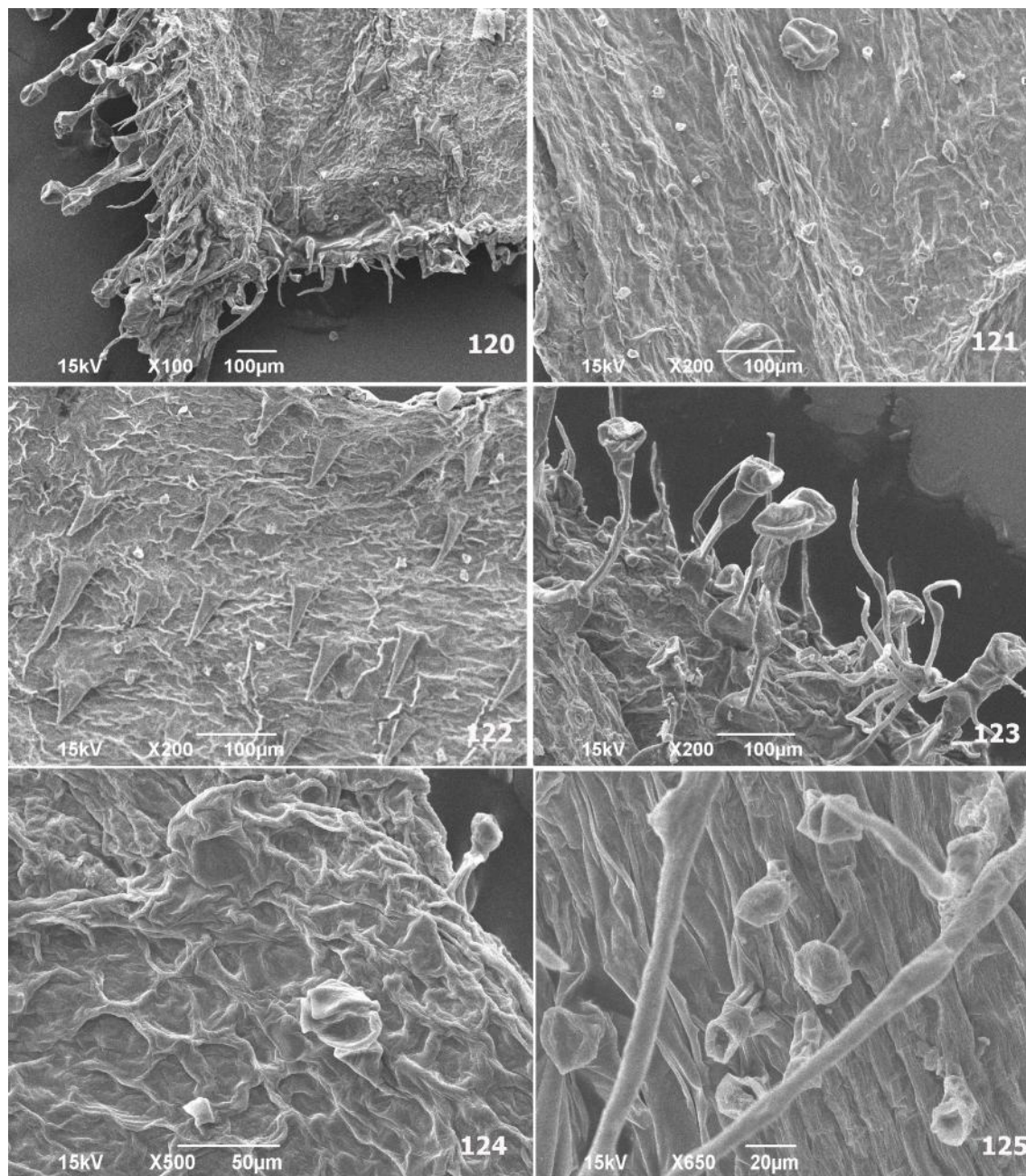


ašica *S. ringens* je dvousnata, sa zelenkastom donjom i crvenkastom gornjom usnom (Slike 114-117). Nervi su jasno izraženi i obrasli beli astim mehani kim trihomama (Slike 117-118). ašica nosi i peltatne trihome žu kaste boje (Slika 119). Krunica je dvousnata, plavoljubi asta (Slike 114-116). Prašnika je dva i epipetalni su, a tu ak sa dvorežnjevitim žigom viri iz krunice. U bazi ovarijuma uo ljive su floralne nektarije (Slika 116). Na površini ašice, krunice i cvetne drške uo avaju se mnogobrojne mehani ke i žlezdane trihome. Žlezdane trihome su predstavljene peltatnim i razli itim morfološkim tipovima kapitatnih trihoma (Slike 120-125).



**Slike 114-119. Cvet *S. ringens*:**

**114-115.** Izgled intaktnog cveta i **116.** izgled otvorenog cveta; **117-119.** Izgled ašice (binokularna lupa): **117.** (7,5 x), **118.** (20 x), **119.** (100 x) gde se zapažaju peltatne trihome ( ).



**Slike 120-125.** SEM mikrografije cvetnih delova *S. ringens*:

**120-122.** SEM mikrografija ašice gde se uo avaju kapitatne trihome tipa II (podtip III) (**120**), peltatne trihome (**121**) i neglandularne trihome (**122**); **123-124.** SEM mikrografija kruni nih listi a, sa podtipom III (**123**) i podtipom IV (**124**) kapitatnih trihoma tipa II; **125.** SEM mikrografija cvetne drške sa podtipom I tipa II kapitatnim trihomom.

Glandularne trihome na listovima i cvetovima *S. ringens* su predstavljene peltatnim, kapitatnim i digitiformnim trihomama.

**Peltatne trihome** *S. ringens* su bile prisutne na nali ju listova (Slike 126-128) i na aši nim listi ima (Slike 119, 121). Sastojale su se iz bazalne elije, kratke drške i sekretorne glavice sastavljene od 12 sekretornih elija, sa 8 elija u spoljašnjem i 4 u unutrašnjem krugu (Slika 128).

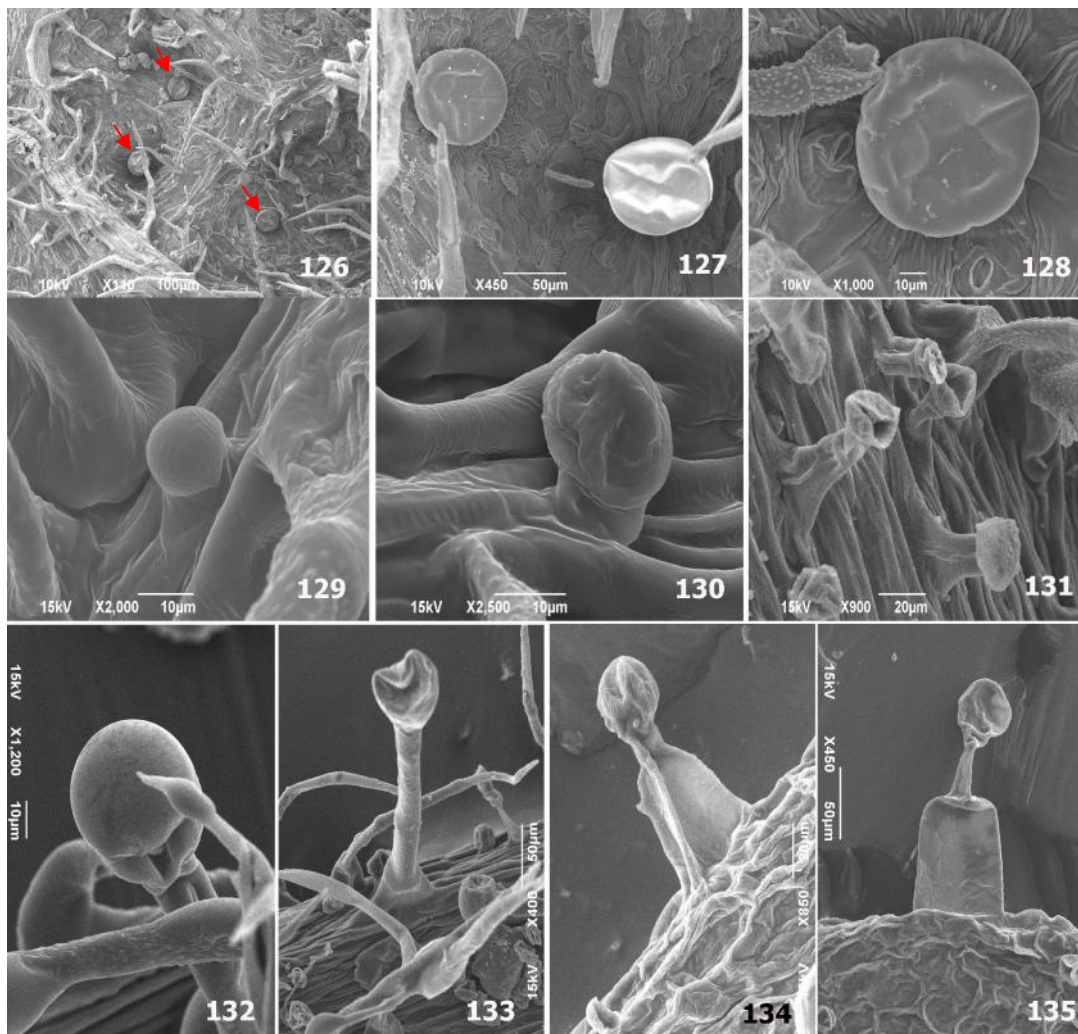
**Kapitatne trihome** su bile raznovrsnije, pa su me u njima identifikovana tri osnovna morfološka tipa sa nekoliko podtipova.

**Tip I** („niske“ kapitatne trihome) je bio prisutan na listovima i sastojao se iz bazalne elije u epidermisu, veoma kratke i široke elije drške i jedno elijske sekretorne glavice sa veoma kutiniziranim elijskim zidom (Slike 102, 106, 129-130, 136-138).

**Tip II** („visoke“ kapitatne trihome) je bio prisutan na listovima i ašici i sastojao se iz bazalne elije, 1 - 3 elije drške i jedno elijske glavice, izme u kojih je kod nekih trihoma umetnuta vratna elija (Slike 120, 123-125, 131-135, 139). Glavica je slabije kutinizirana u odnosu na tip I. U okviru ovog tipa je izdvojeno pet morfoloških podtipova:

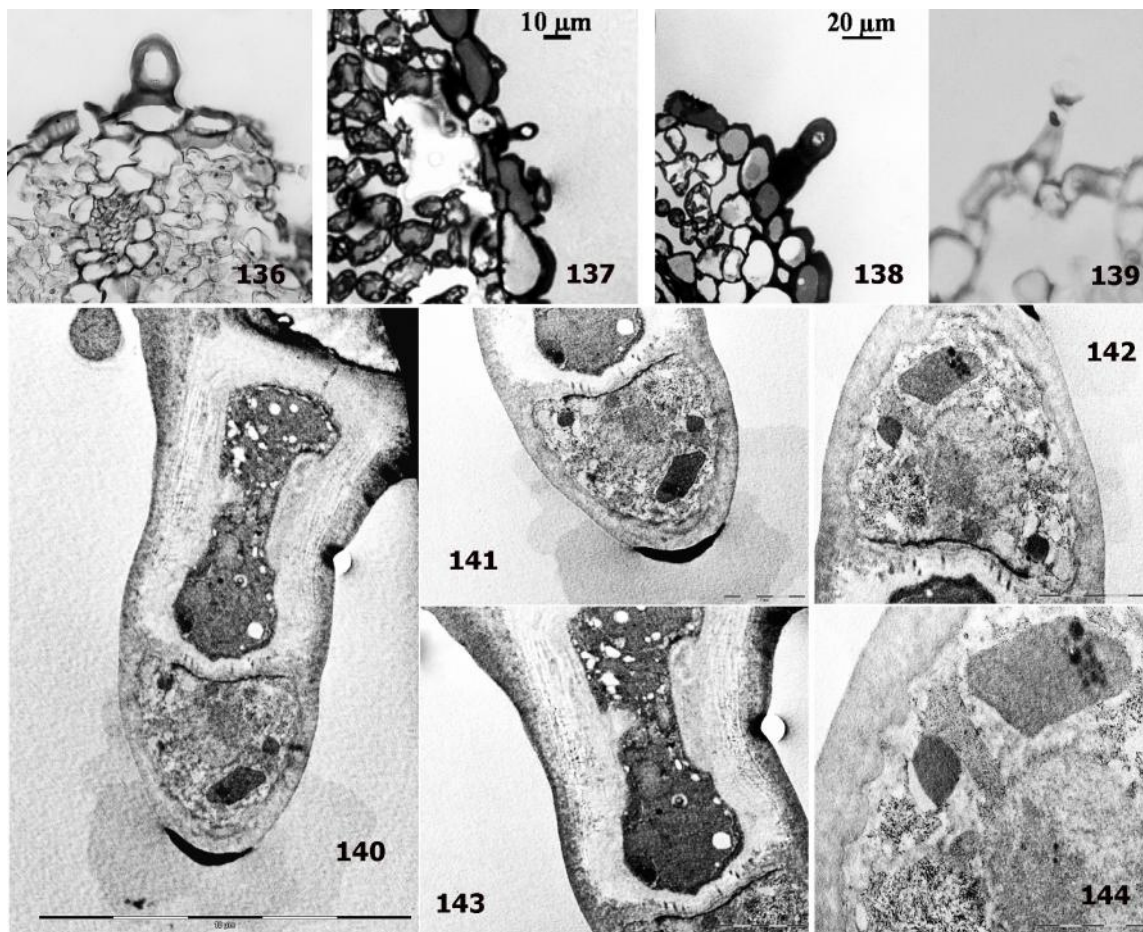
*Podtip I* je na en na listovima i ašici. Drška je široka i proširena u bazalnom delu. Bazalna elija se razlikuje od ostalih elija epidermisa. Izme u drške i glavice je umetnuta kratka vratna elija. U postsekretornoj fazi dolazi do ugibanja kutikule u gornjem delu glavice i do stvaranja peharastog udubljenja (Slike 125, 131, 139). *Podtip II* je na en na cvetnoj dršci. Drška ovih trihoma je valjkasta, a pukotine u kutikuli nastaju sa donje strane glavice. Nema jasnog prelaza izme u drške i glavice; kutikula se ugiba u donjem delu glavice (Slika 132). *Podtip III* je prona en na cvetnoj dršci, ašici i krunici. Drška trihome je valjkasta i gra ena od tri elije. Do ugibanja kutikule dolazi na bo nom delu glavice. Ne postoji jasan prelaz izme u drške i glavice (Slika 120, 123, 133). *Podtip IV* je na en na krunici. Drška je masivna i trostrana, proširena u donjem i sužena u gornjem delu, sa izraženim prelazom ka glavici (Slika 124, 134). *Podtip V* je tako e na en na krunici. Drška je pljosnata, široka i prili no tanjom vratnom elijom povezana sa glavicom. Kutikula se ugiba na bo nom delu glavice (Slika 135).

**Digitiformne trihome** su prona ene samo na nali ju lista. Sastoje se iz apikalne elije i 1 - 2 elija drške. Apikalna elija je zaobljena i sli ne širine kao i elije drške. Apikalna elija ima debele zidove koji su slabo kutinizirani, a subkutikularni prostor nije razvijen (Slike 140-144).



**Slike 126-135. Trihome *S. ringens*:**

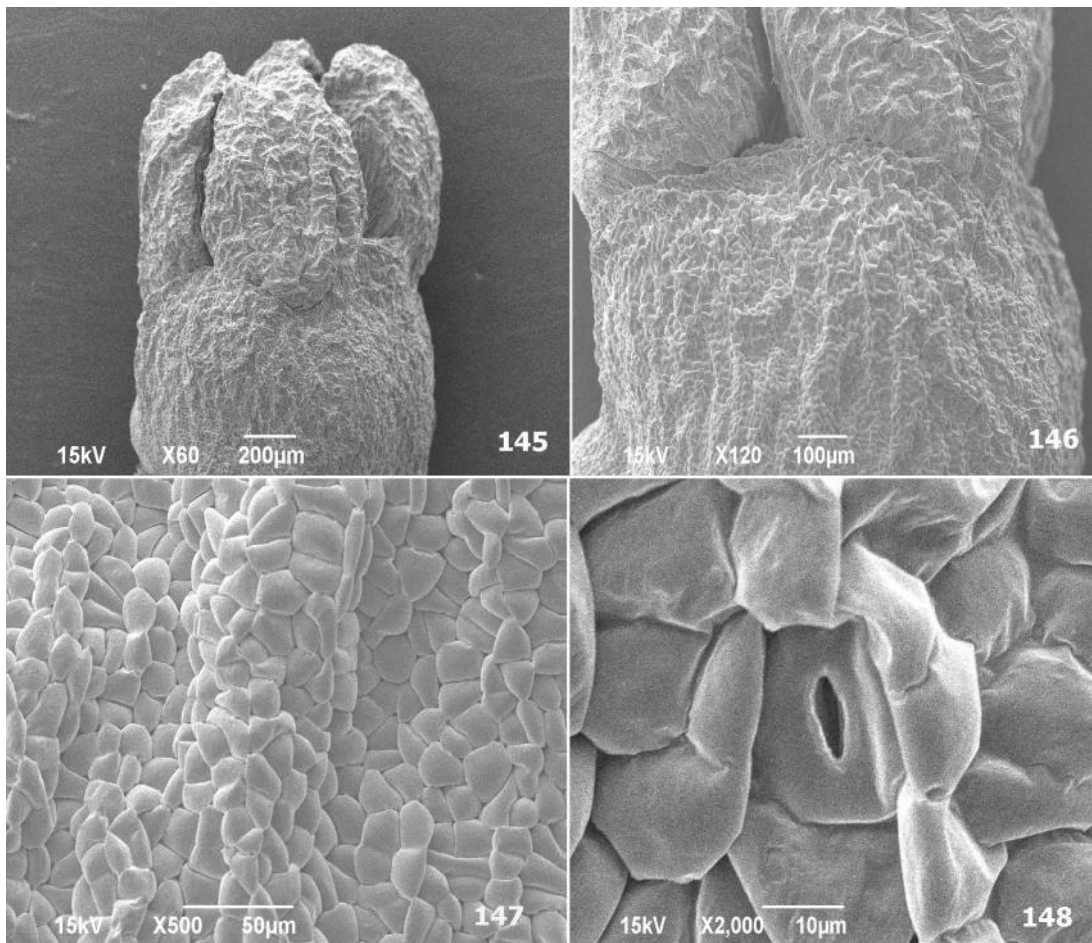
**126-128.** SEM mikrografije pokazuju prisustvo peltatnih trihoma na nali ju listova ( ); **129-130.** SEM mikrografije tipa I kapitatnih trihoma na nali ju lista; **131-133.** SEM mikrografije koje pokazuju kapitatne trihome tipa II na cvetnoj dršci: podtip I (**131**), podtip II (**132**), podtip III (**133**); **134-135.** SEM mikrografije krunice sa podtipom IV (**134**) i podtipom V (**135**).



Slike 136-144. Trihome *S. ringens*:

**136-138.** Popre ni preseći lista sa kapitatnim trihomama tipa I na nali ju lista; **139.** Popre ni presek kapitatne trihome tipa II (podtip I) na nali ju lista; **140-144.** TEM mikrografije digitiformnih trihoma.

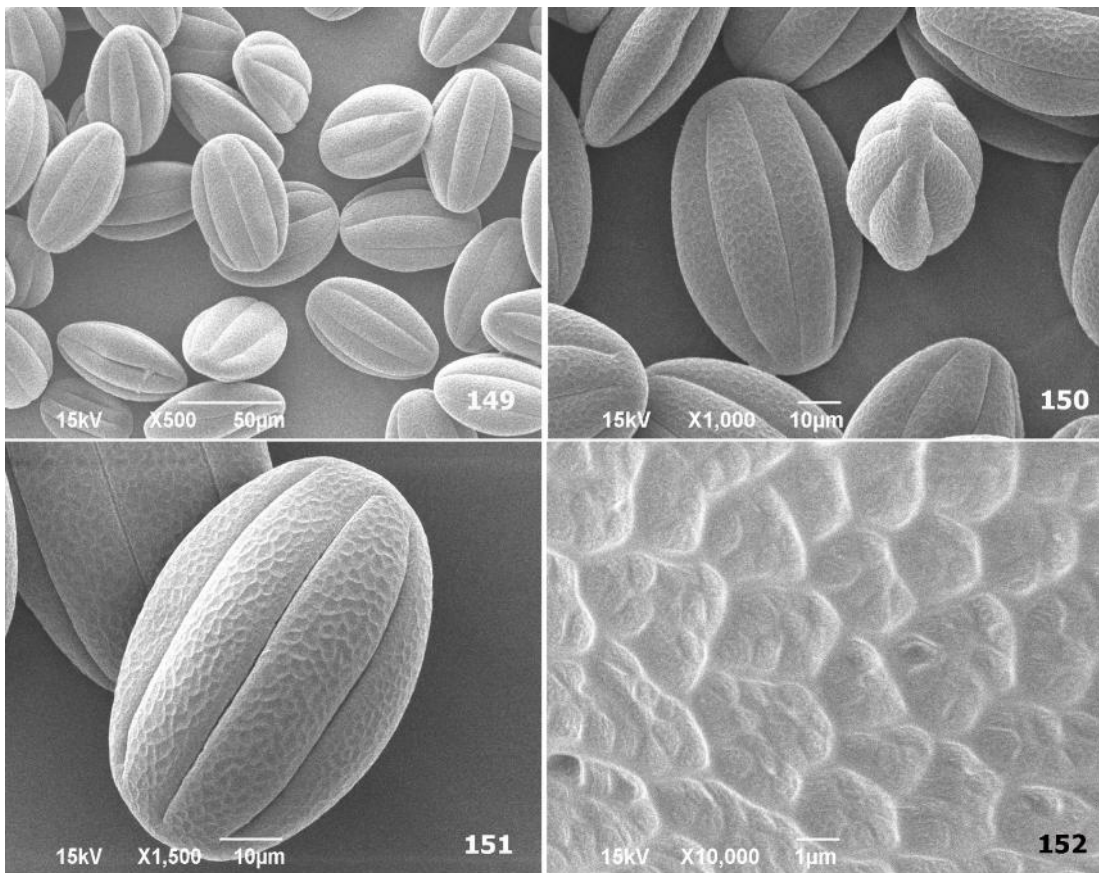
Floralne nektarije *S. ringens* su u obliku prstena koji je smešten u bazi etvororežnjevito ovarijuma (Slike 145-146). elije epidermisa nektarija su poligonalne, tesno me usobno spojene (Slika 147), sa modifikovanim stomama za izlu ivanje nektara (Slika 148).



**Slike 145-148.** Nektarije *S. ringens*:

**145-146.** Izgled floralne nektarije; **147.** Epidermis nektarije; **148.** Modifikovane stome u epidermisu nektarije.

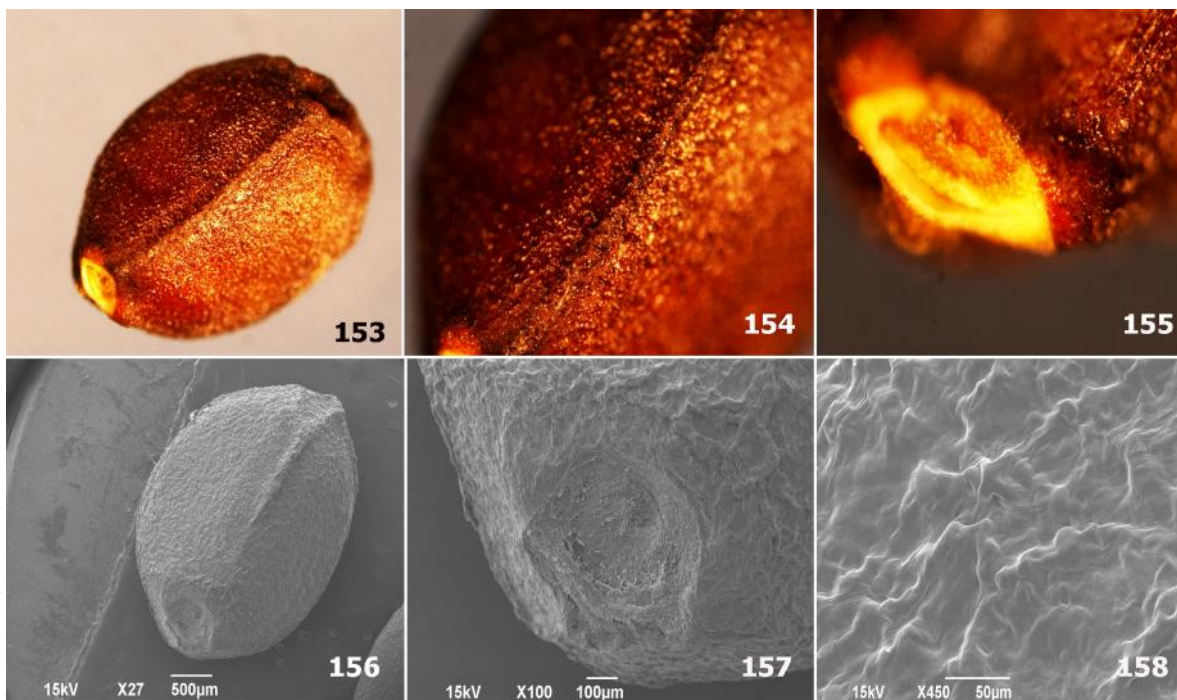
Polenova zrna *S. ringens* su pojedina na (monade), radijalno simetri na i izopolarna. Dužina polarne ose (P) iznosi 63,71  $\mu\text{m}$ , a ekvatorijalne ose (E) 45,00  $\mu\text{m}$ . Oblik polenovog zrna je proladni ( $P/E=1,42$ ). Polenova zrna su heksakolpatna, sa simetri no postavljenim kolpama dugim najviše 58,40  $\mu\text{m}$  i mezokolpijumom od 13,65  $\mu\text{m}$  (Slike 149-151). Ornamentacija egzine je biretikulatna (Slika 152).



Slike 149-152. Polen *S. ringens*:

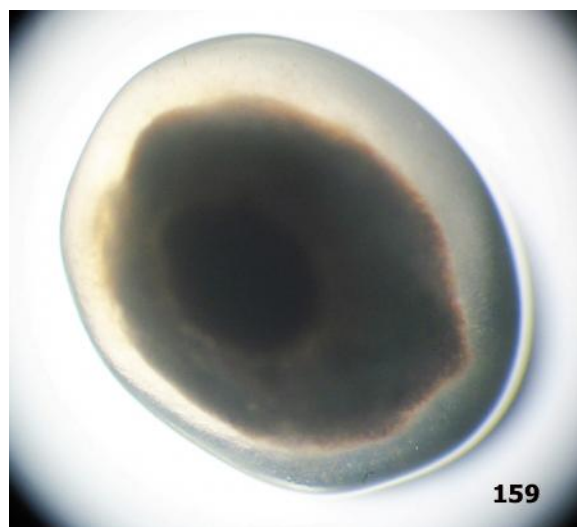
149-151. Izgled polenovih zrna; 152. Površinska ornamentacija egzine.

Orašice *S. ringens* (N=10) su duge  $3,08 \pm 0,16$  mm i široke  $2,27 \pm 0,16$  mm, sa odnosom dužina/širina 1,34. Boja orašica je tamno-smeđa, a oblik sferičan (Slike 153, 156). Ventralna strana orašice je ispupčena, a ventralni šav veoma dobro uočljiv (Slike 153-154, 156). Vršni deo i bazalni deo su tupo zašiljeni, a bazalni ožiljak okrugao i u potpunosti pomešten na ventralnu stranu (Slike 153-156). Površina orašica je sa krupnim, nepravilnim naborima (retikularna ornamentacija) (Slika 158). Orašice su proizvodile žućkastu, transparentnu sluz bez fibrila, ali veoma sporu; tek nakon 45 minuta nakon kvašenja, debljina sluznog omotača je bila veća od 0,5 mm (Slika 159).



Slike 153-158. Orašice *S. ringens*:

153-155. (binokularna lupa): **153.** (25 x), **154.** (50 x), **155.** (100 x); **156-158.** SEM mikrografije orašice, **156.** Izgled orašice, **157.** Izgled bazalnog dela i stopalnog ožiljka orašice, **158.** Površinska ornamentacija orašice.



Slika 159. Miksokarpija orašica *S. ringens*.



**Anatomske karakteristike listova.** Iako su se listovi prou avanih vrsta *Salvia* morfološki veoma razlikovali, opšti plan gra e listova je generalno bio veoma uniforman. Listovi prou avanih vrsta su bifacijalni, što je zaklju eno i za druge vrste *Salvia* (Özdemir i enel, 1999; Baran i dr., 2008; Kahraman i dr., 2009; Özdemir i dr., 2009), mada su listovi *S. glutinosa* bili ekcvifacijalni (Kahraman i dr., 2009). Epidermis lista je bio jednoslojan sa dobro razvijenom kutikulom, s tim da su elije epidermisa lica nešto krupnije u odnosu na epidermis nali ja, kao što je opisano i u studijama Ozkan i Soy (2007), Kahraman i dr. (2010b) i Shirsat i dr. (2012). Kao i svi predstavnici tribusa Mentheae, vrste roda *Salvia* imaju amfi- i hipostomati ne listove (Moon i dr., 2009). Stome kod sve tri vrste su paracitnog tipa, pri emu su listovi *S. amplexicaulis* amfistomati ni, a *S. jurisicii* i *S. ringens* hipostomati ni. Listovi *S. napifolia* (Baran i dr., 2006) i *S. argentea* (Baran i dr., 2008) su nosili diacitne stome sa obe strane lista, što je saopšeno i za druge vrste roda *Salvia* (Özdemir i enel, 1999). Predstavnici tribusa Mentheae imaju pet osnovnih tipova stoma (anomocitne, diacitne, anizocitne, dialelocitne i aktinocitne), pri emu su neretko dva tipa stoma bila prisutni na listovima iste vrste (Moon i dr., 2009). Salimpour i dr. (2012) su našli da listovi osam vrsta žalfija iz Irana nose paracitne i diacitne stome.

Mezofil je bio gra en od palisadnog (ka adaksijalnoj strani) i sun erastog tkiva (ka abaksijalnoj strani), gde je kod analiziranih vrsta varirao broj slojeva koje grade ova dva tkiva. Sli no listovima drugih vrsta *Salvia*, listovi *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* su posedovali 1 - 2 sloja palisadnog i 3 - 4 sloja sun erastog tkiva (Baran i dr., 2006, 2008; Özdemir i dr., 2009), dok je kod *S. ringens* palisadno tkivo bilo zastupljeno u 4 - 5 slojeva elija. Kod vrsta otvorenih i sušnih staništa, kakve su analizirane vrste *Salvia*, sa abaksijane strane postoji dodatni sloj palisadnog tkiva kao odgovor na intenzivnu insolaciju (Moon i dr., 2009; Kahraman i Dogan, 2010), koji u uzorcima u ovoj studiji nije prona en.

Provodni snopi i u listovima su kolateralni i zatvoreni, sa floemom orjentisanim ka nali ju i ksilemom ka licu lista. Glavni nervi listova analiziranih vrsta su ispunjeni višeslojnim parenhimom, sa kolenhimom ka abaksijalnoj (uz sam provodni snopi ) i malobrojnim sklerenhimskim vlaknima ka adaksijalnoj strani (subepidermalno). Prema literaturnim podacima glavni nerv vrsta ovog roda okružen je sarom od uglastog ili

lakunarnog kolenhima (Özdemir i Senel, 1999; Baran i dr., 2006, 2008; Kahraman i dr., 2010a). Moon i dr. (2009) su uočili da vrste tribusa *Mentheae* poseduju grupacije kolenhinskog tkiva i ka licu i ka nali ju lamine, ali da se kod nekih predstavnika javljaju debelozidne sklerenhimske elije, zahvaljujući kojima provodni snopi deluje kao mehanička potpora koja sprečava cepanje lamine (Moon i dr., 2009). Kod *S. viridis*, sklerenhim je nastao uz floem, ka nali ju lista (Özdemir i dr., 2009).

**Anatomske karakteristike stabala.** Stablo *S. jurisicii* i *S. amplexicaulis* je na poprečnom preseku četvorouglasto, dok je kod *S. ringens* okruglo. Stablo velikog broja žalfija je četvorouglasto (Baran i dr., 2006, 2008; Salimpour i dr., 2012). Smatra se da je opšti plan primarne građe stabla sličan kod različitih vrsta *Salvia* (Özdemir i Senel, 1999; Kandemir, 2003; Baran i dr., 2006, 2008; Özkan i Soy, 2007; Aktas i dr., 2009; Kahraman, 2009, 2010a,b; Koyuncu i dr., 2009; Özdemir i dr., 2009; Kahraman i Dogan, 2010; Salimpour i dr., 2012; Shirsat i dr., 2012).

Na površini stabla vrsta roda *Salvia* analiziranih u ovom radu se nalazio jednoslojni epidermis sa kutikulom građen od okruglih ili kvadratnih elija. Korteks stabla *S. jurisicii* i *S. ringens* je građen od subepidermski distribuiranog kolenhima i parenhima, a kod *S. amplexicaulis* kolenhim je uočeno samo na uglovima stabla. Kolenhim je obično prisutan u vidu prstena od nekoliko kontinuiranih slojeva elija, a višeslojan je u uglovima stabla dajući im karakterističan četvorostrani oblik (Özdemir i Senel, 1999; Kandemir, 2003; Baran i dr., 2006, 2008; Özkan i Soy, 2007; Özdemir i dr., 2009; Salimpour i dr., 2012). U nekim slučajevima se među kolenhimskim elijama nalazi i 1 - 2 sloja kolenhima (Kahraman i Dogan, 2010).

Iako se četvorostrano stablo i prisustvo kolenhima smatraju specifičnim za *Lamiaceae*, Aktas i dr. (2009) su izvestili da *S. tchihatcheffii* poseduje okruglo fertilno i sterilno stablo. U fertilnom stablu kolenhim je u potpunosti odsustvovao, dok je u sterilnom bio prisutan u nekoliko kontinuiranih slojeva (Aktas i dr., 2009). Provodni cilindar započinje prstenom sklerenhinskog tkiva; iako ne postoji odvojen sklerenhimski prsten, veoma su negrupisana sklerenhimska vlakna prisutna uz elemente floema (Kandemir, 2003; Baran i dr., 2006, 2008; Özkan i Soy, 2007; Özdemir i dr., 2009; Kahraman i dr., 2010a,b;

Salimpour i dr., 2012). Ksilernih elemenata je više (traheje i traheidi) i znatno su krupniji u pore enju sa floemskim. U ovom radu su zapažena manja ili ve a ostrvca sklerenhimskih elija iznad floema. Provodni elementi su organizovani u prstenove užeg floema i šireg ksilema izme u kojih je manje-više uo lživ kambijum, što je uo eno i kod drugih vrsta žalfija (Baran i dr., 2006, 2008; Özkan i Soy, 2007; Ozdemir i dr., 2009). Jednoslojni ili višeslojni sržni zraci kod stabala analiziranih vrsta se protežu u radijalnom pravcu od korteksa do srži. Višeslojni sržni zraci su se sastojali od 5 - 12 slojeva elija, što je u skladu sa rezultatima studije strukture stabala 8 vrsta žalfija (Salimpour i dr., 2012). U centralnom delu stabla je smeštena srž sastavljena od krupnih poligonalnih ili okruglih parenhimskih elija sa mnoštvom intercelulara, koje raskidanjem stvaraju centralnu reksigenu šupljinu (Baran i dr., 2006, 2008; Ozdemir i dr., 2009; Salimpour i dr., 2012).

**Karakteristike trihoma.** U indumentumu biljnih organa (listova, stabala, delova cveta) analiziranih vrsta *Salvia* bile su prisutne neglandularne (mehani ke) i glandularne trihome, što je karakteristika vrsta porodice Lamiaceae (Werker i dr., 1985). Rezultati prethodnih studija su pokazali prisustvo raznovrsnih trihoma na vegetativnim i reproduktivnim organima *S. blepharophylla* (Bisio i dr., 1999), *S. officinalis* (Corsi i Bottega, 1999), *S. sclarea* (Ozdemir i Senel, 1999), *S. hypargeia* (Kandemir, 2003), *S. napifolia* (Baran i dr., 2006), *S. verticillata* (Krsti i dr., 2006), *S. blepharocleana* (Özkan i Soy, 2007), *S. recognita* (Özkan, 2008), *S. cadmica* (Özkan i dr., 2008), *S. tchihatcheffii* (Akta i dr., 2009), *S. limbata* i *S. palestina* (Kahraman i Dogan, 2010), *S. chrysophylla* (Kahraman i dr., 2010b), *S. pleibeia* (Shirsat i dr., 2012), *S. fruticosa* (Al Sheef i dr., 2013), *S. quezelii* (Çelep i dr., 2014), *S. aegyptiaca* (Janoševi i dr., 2016), itd.

Trihome su tradicionalno koriš ene kao pouzdani karakteri u biljnoj taksonomiji (Wagner, 1991; Xiang i dr., 2010). Glandularne trihome proizvode veliku koli inu fitokonstituenata, od kojih su mnogi biološki aktivni i poznati po svojoj primeni u prehrambenoj, farmaceutskoj i parfimerijskoj industriji (Dyubeni i Buwa, 2011).

Neglandularne trihome naj eš e gusto obrastaju epidermis ime pružaju biljkama zaštitu od herbivora i patogena iz vazduha, pove avaju toleranciju na ekstremne temperature, održavaju vodni balans u listovima, odbijaju sun eve zrake i tako spre avaju

pregrevanje, itd. Smatra se da mnogobrojne neglandularne trihome kod biljaka suvih i otvorenih staništa predstavljaju jednu od njihovih kseromorfnih karakteristika (Werker, 2000; Mayekiso i dr., 2009; Dyubeni i Buwa, 2012). Kratke, duge i granate (dendriformne) trihome su opisane kao tri osnovna tipa neglandularnih trihoma u tribusu *Menthae* (Moon i dr., 2009).

U ovoj studiji, neglandularne trihome su uočene na listovima, stablima i cvetovima analiziranih vrsta i u značajnoj mjeri su se razlikovale po strukturi (broj elija koje ih grade, izgled baze i vrha, itd). Generalno su se izvojila dva osnovna tipa neglandularnih trihoma, jedno elijske (kratke) i više elijske (duge). Oba tipa trihoma su na površini nosila papilozna zadebljanja za koje se smatra da potječu od elijskog zida ili kutikule (Werker, 2000). Papile su uočene na neglandularnim trihomama vrsta *Salvia*, kao što su *S. verticillata* (Krstić i dr., 2006), *S. fruticosa* (Al Sheef i dr., 2013) i dr. Jedno elijske trihome su bile uspravne i posjedovale su manje-više trouglast oblik, široku bazu i zašiljen vrh; na one su uglavnom u indumentumu nalazila listova. Više elijske trihome su bile grane od najčešće 2 - 6 elija, a njihova se širina smanjivala idući od proširene baze kao veoma uzanom vrhu. Najčešće su bile izuvijane ili polegale ka epidermisu. Na one su kako na listovima, tako i na stablu i delovima cveta. Slične mehanike trihome su uočene na biljnim delovima mnogih vrsta *Salvia*: *S. sclarea* (Özdemir i enel, 1999), *S. hypargeia* (Kandemir, 2003), *S. verticillata* (Krstić i dr., 2006), *S. recognita* (Özkan, 2008), *S. cadmica* (Özkan i dr., 2008), *S. chrysophylla* (Kahraman i dr., 2010), *S. fruticosa* (Al Sheef i dr., 2013), *S. quezelii* (Çelep i dr., 2014), *S. aegyptiaca* (Janošević i dr., 2016).

Glandularne trihome su epidermske strukture specijalizovane za biosintezu i sekreciju različitih sekundarnih metabolita koji imaju važne biološke uloge u biljkama (Lange i Turner, 2013). Gustina glandularnih trihoma je najveća na mladim listovima što se smatra adaptivnim mehanizmom kojim se oni štite od herbivora, pregrevanja, UV radijacije i povećane transpiracije (Wagner i dr., 2004). Trihome su veoma varijabilne po izgledu, strukturi, gustini, kako između biljnih vrsta, tako i između jedinki iste vrste, pa i različitih organa iste jedinke (Serrato-Valenti i dr., 1997; Ascensão i dr., 1999; Çelep i dr., 2014).

Diverzitet trihoma kod biljaka porodice Lamiaceae može imati taksonomski značaj na više nivoa klasifikacije (Moon i dr., 2009).

Kod većine biljaka porodice Lamiaceae su zastupljena dva tipa glandularnih trihoma, peltatne (štitolike) i kapitatne (glavičaste), koje se razlikuju po obliku i načinu na koje oslobađaju sekretovane produkte. Sekretovani materijal se iz kapitatnih trihoma oslobađa kroz pore na kutikuli elije glavice odmah nakon produkovanja. Nasuprot tome, peltatne trihome akumuliraju sekretovani materijal u subkutikularnom prostoru koji biva oslobođen tek kada kutikula pukne (Siebert, 2004). Sekretorni produkti glandularnih trihoma imaju različite biološke uloge kao što su hemijska odbrana biljaka i privlačenje insekata oprašivača, ali specifična funkcija svakog tipa trihoma nije potpuno razjašnjena (Ascensão i dr., 1999). Baran i dr. (2010) su pretpostavili da karakteristike kao što su brojnost i diverzitet glandularnih trihoma na biljnim organima, prisustvo ili odsustvo vratne elije, debljina spoljašnjih elijskih zidova i dužina drške mogu ukazati na kseromorfne karakteristike biljaka.

Detaljna analiza morfologije, anatomije i ultrastrukture trihoma je veoma važna za razumevanje njihove funkcije. Ultrastrukturne analize su važne u istraživanju trihoma, jer se njima utvrđuju veze između morfologije i citologije sa jedne i sekretornih procesa sa druge strane. Na biljnim organima vrsta analiziranih u ovom radu nalaze se peltatne, kapitatne i digitiformne trihome.

Prisustvo peltatnih trihoma (originalno „subsesilne trihome“) je univerzalno kod tribusa Mentheae (Moon i dr., 2009). Peltatne trihome su uočene na naličju listova i na abaxijalnim listovima svih analiziranih vrsta, gde *in vivo* imaju formu žučkast-smeđih balonika i raspoređene na listnim nervima i između njih. Sastoje se iz bazalne elije u epidermisu, kratke drške i široke sekretorne glavice sastavljene od različitog broja elija raspoređenih u 1 - 2 kruga (Fahn, 1988). Glavica peltatnih trihoma *S. jurisicii* se sastojala iz 8 elija (u jednom krugu), a *S. ringens* od 12 elija (8 u spoljašnjem i 4 u unutrašnjem krugu). Broj elija sekretorne glavice *S. amplexicaulis* nije utvrđen, jer su posmatrane u postsekretornoj fazi. Broj elija glavice je konstantan unutar vrste (Moon i dr., 2009), ali varira među vrstama roda *Salvia*, od četiri elije kod *S. blepharophylla* (Bisio i dr., 1999),

*S. divinorum* (Siebert, 2004), *S. verticillata* (Krstić i dr., 2006) do šest ili osam elija u jednom krugu kod *S. aurea* (Serrato-Valenti i dr., 1997), *S. officinalis* (Werker i dr., 1985), *S. fruticosa* (Werker i dr., 1985; Al Sheef i dr., 2013) ili 12 - 16 elija raspoređenih u dva koncentrična kruga (sa 4 elije u centralnom i osam i više u perifernom krugu) (Corsi i Bottega, 1999; Kamatou i dr., 2006; Özkan, 2008; Baran i dr., 2010; Kahraman i dr., 2010a,b).

Rezultati analize ultrastrukture peltatnih trihoma *S. fruticosa* ukazuju da su dominantne organele u bazalnoj eliji velike, prozirne vakuole. elija drške poseduje gustu citoplazmu, tamne organele i sitne, svetlije vakuole. U elijama sekretorne glavice najveći prostor zauzimaju krupne vakuole i osmofilne kapi. U presekretornoj fazi, kutikula vrsto naleže na sekretorne elije, a zatim se odvaja od njih i postaje naborana sa nakupljanjem sekretovanog materijala u subkutikularnom prostoru, da bi pri kraju sekretorne faze ponovo postala glatka. Na samom kraju dolazi do njenog pucanja i oslobađanja akumuliranog materijala (Al Sheef i dr., 2013).

Kapitatne trihome se najčešće sastoje iz 1 - 2 elije drške i 1 - 2 elije koje formiraju okruglu ili kruškoliku sekretornu glavicu (Werker i dr., 1985; Fahn, 1988). Kapitatne trihome su važan taksonomski karakter biljaka porodice Lamiaceae, jer predstavljaju specijalizaciju na veoma izveden vid polinacije (Navarro i El Oualidi, 2000; Kahraman i dr., 2009).

Kod vrsta istraženih u ovom radu, kapitatne trihome su bile morfološki znatno varijabilnije i uključile su nekoliko različitih morfoloških tipova kod svake od posmatranih vrsta. Tip I je generalno uključivao „niske“ kapitatne trihome građene od kubične ili cilindrične bazalne elije, kratke drške i okrugle ili ovalne jedno elijske sekretorne glavice, sa ili bez vratne elije. Ovaj tip je bio prisutan kod svih vrsta. Kod *S. amplexicaulis* je uočen znatan diverzitet ovih trihoma i izdvojena tri podtipa, dok su kod druge dve vrste trihome tipa I bile nešto uniformnije. Tip II je obuhvatio „visoke“ kapitatne trihome, građene od bazalne elije, duge drške i jedno elijske glavice, sa ili bez vratne elije. Trihome ovog tipa su pokazale veliku varijabilnost morfoloških formi, pa su podeljene u 5 podtipova, a bile su prisutne samo na delovima cveta *S. ringens*.

Kod vrsta roda *Salvia* su zapažene značajne varijacije u dužini drške i obliku glavice (Corsi i Bottega, 1999; Siebert, 2004; Kamatou i dr., 2006, 2009; Çelep i dr., 2014). Imaju i u vidu varijabilnost kapitatnih trihoma, Werker i dr. (1985) su prvi put klasifikovali kapitatne trihome kao tip I, II i III u odnosu na njihovu morfologiju i na in sekrecije. Corsi i Bottega (1999) su dodatno opisali tip IV kod *S. officinalis*. Moon i dr. (2009) na osnovu strukture drške izdvajaju dva osnovna tipa glavi astih trihoma: kapitatne (sa jedno elijskom drškom) i pilatne (sa više elijskom drškom). Pojedini istraživači su podelili trihome u dva osnovna tipa imaju i u vidu dužinu drške, morfologiju sekretorne glavice i na in sekrecije (Serrato-Valenti i dr., 1997; Ascensão i dr., 1999; Bisio i dr., 1999). Serrato-Valenti i dr. (1997) su opisali 2 tipa kapitatnih trihoma kod *S. aurea*, a slični tipovi su prepoznati kod *S. blepharophylla* (Bisio i dr., 1999), *S. albicaulis*, *S. dolomitica* (Kamatou i dr., 2007) i dr. Kod nekih vrsta su izdvojena tri tipa kapitatnih trihoma, kao što je *S. argentea* (Özdemir i dr., 1999), *S. verticillata* (Krstić i dr., 2006) i *S. smyrnea* (Baran i dr., 2010), dok je kod *S. chrysophylla* nađeno čak 4 tipa (Kahraman i dr., 2010b).

Ultrastrukturne analize pokazuju da eliju glavice kapitatnih trihoma *S. fruticosa* karakteriše gusta citoplazma, tamne organele i sitne vakuole. Glavicu pokriva debeo sloj kutikule kada je trihoma mlada, a njenim sazrevanjem se stvara mali subkutikularni prostor. Sekretovani materijal se na kratko zadržava u subkutikularnom prostoru odakle se izliva, verovatno kroz intaktnu kutikulu. Nakon oslobađanja sekretovanog materijala, dolazi do skupljanja sekretorne glavice i naginjanja trihome ka epidermisu, nakon čega se ona u potpunosti deformiše (Al Sheef i dr., 2013).

Digitiformne trihome se sastoje od 3 - 4 elije približne širine u nizu, bez jasne razlike između apikalne i ostalih elija (Ascensão i dr., 1999; Al Sheef i dr., 2013). U ovom istraživanju, digitiformne trihome su bile prisutne na listovima *S. ringens* i *S. jurisicii*. Sastojale su se iz apikalne elije, 1 - 2 središnje elije i bazalne elije u epidermisu. Slične digitiformne trihome su bile prisutne u indumentumu listova *S. fruticosa* i kod drugih predstavnika familije Lamiaceae, kakav je *Plectranthus ornatus* (Ascensão i dr., 1999).

Na TEM mikrofografijama se uočava da apikalna elija poseduje zaobljen vrh, debele zidove i veoma je bogata citoplazmom, ali subkutikularni prostor nije razvijen. U apikalnoj

eliji se uo avaju prozra ne vakuole, dok je elija ispod nje ispunjena gustom citoplazmom sa mnoštvom tamno obojenih organela. U ranijem istraživanju *S. fruticosa* je prime eno da u sekretornoj fazi digitiformne trihome poseduju gustu citoplazmu, mnogobrojne tamne organele, osmiofilne kapi, prozra ne vakuole i spoljašnje elijske zidove pokrivena debelom kutikulom. Tokom daljeg sazrevanja trihome, dolazi do akumuliranja sekretornih produkata i širenja periplazmati nog prostora što vodi retrakciji elijske membrane kroz elijski zid (Al Sheef i dr., 2013).

**Karakteristike orašica i miksokarpija.** Plod vrsta roda *Salvia* je merikarp (podeljeni plod) koji nastaje u dimernom plodniku koji se sekundarno deli na 4 plodi a (orašice). Plod *Salvia* je istovremeno i njihovo seme, jer perikarp vrsto srasta sa tankom semenja om (Marin, 1996). Duleti -Lauševi i Marin (1999) navode tri osnovna regiona perikarpa (egzokarp, mezokarp i endokarp), dok Ryding (2010) izdvaja poseban sklerenhimski region, smešten izme u mezokarpa i endokarpa. Miksokarpijom se ozna va pojava produkcije sluzi kada orašice do u u kontakt sa vodom. elije koje produkuju sluz su smeštene u egzokarpu i njihovi elijski zidovi sadrže higroskopne spiralne fibrile (Duleti -Lauševi i Marin, 1999; Ryding, 2010). Prema Kahraman i dr. (2011) prou avanje morfologije orašica nam donosi korisne podatke na razli itim taksonomskim nivoima u okviru familije Lamiaceae. U taksonomskim prou avanjima su najvažnije slede e morfo-anatomske karakteristike orašica: obilik, veli ina, bazalni deo, vršni deo, oblik i položaj stopalnog ožiljka, ornamentacija površine orašica, debljina pojedinih slojeva perikarpa, prisustvo miksokarpije i izgled sluzi. Debljina perikarpa i proporcija njegovih individualnih slojeva kao i morfologija merikarpa mogu biti koriš ene u sistematici roda *Salvia* (Hedge, 1970; Habibvash i dr., 2007). Marin i dr. (1996) sugerišu da debljina egzokarpa, mezokarpa i endokarpa variraju me u vrstama i da mogu biti korisni dopunski taksonomski markeri. Ornamentacija površine merikarpa i druge karakteristike orašica *Salvia* mogu biti zna ajni taksonomski markeri na nižim nivoima klasifikacije (Kahraman i dr., 2011).

Boja orašica vrsta roda *Salvia* pruo avanih u ovom radu je svetlo do tamno sme a, što je u saglasnosti sa Özkan i dr. (2009) i Kahraman i dr. (2011). Dužina orašica je bila u opsegu 1,97 - 3,08 mm, a širina 1,05 - 2,27 mm. Po dimenzijama orašica, vrste su se



rangirale kao *S. amplexicaulis* < *S. jurisicii* < *S. ringens*. Odnos dužine i širine se kretao od 1,34 (*S. ringens*) preko 1,45 (*S. jurisicii*) do 1,88 (*S. amplexicaulis*). Ovi kvantitativni podaci su u skladu sa onima koje su dobili Özkan i dr. (2009) i Kahraman i dr. (2011) za druge vrste ovog roda. Na osnovu odnosa dužine i širine datih za 12 taksona roda *Salvia* (Özkan i dr., 2009), oblik orašica *S. jurisicii* i *S. ringens* je okarakterisan kao sferičan, a *S. amplexicaulis* prolatno-sferičan. Ova dva oblika orašica su najčešća među ranije istraživanim vrstama ovog roda iz Turske (Özkan i dr., 2009; Kahraman i dr., 2011). Vršni deo analiziranih orašica je zaobljen, a bazalni deo sužen. Prema Moon i dr. (2009), orašice *Salviniae* poseduju okrugao stopalni ožiljak bez produženog dela, koji se nalazi kod *Nepetinae* i *Menthinae* prostiru i se u vidu U ili V-oblika na ventralnom delu merikarpa. Stopalni ožiljak je kod analiziranih vrsta pomešten ka ventralnoj strani, okruglog ili trouglastog oblika (*S. amplexicaulis*). Slike morfološke karakteristike orašica opisane su i kod drugih analiziranih vrsta žalfija, uglavnom od strane istraživača iz Turske (Özkan i Soy, 2010; Kahraman i Dogan, 2010; Kahraman i dr., 2010b, 2011; Büyükkartal i dr., 2011), Irana (Sallimpour i dr., 2012; Mousavi i dr., 2013) i Rumunije (Ifrim, 2012).

Trihome nisu bile prisutne na površini proučavanih orašica, što je u saglasnosti sa Büyükkartal i dr. (2011) i Kahraman i dr. (2011). Merikarpi koji na svojoj površini nose neglandularne i/ili glanularne trihome, nemaju sposobnost produkcije sluzi, ili je ona svedena na minimum (Duleti -Laušević i Marin, 1999). Ornamentaciju merikarpa stvaraju spoljašnji zidovi elija egzokarpa (Özkan i dr., 2009). Kod svih analiziranih vrsta ornamentacija površine je retikulatna, sa manje-više izraženim nepravilnim naborima. Marin (1996) je na površini orašica *S. ringens* uočio nepravilne strukture, iako su druge vrste iz sekcije *Salvia* pokazale pravilniju skulpturiranost. Ifrim (2012) opisuje ornamentaciju orašica *S. ringens* kao verukatnu, mada se na samoj površini orašica ne mogu razlikovati jasno definisana, izdignuta polja karakteristična za ovaj tip. Orašice *S. jurisicii* pokazuju sličan tip skulpturiranosti kao i ostale vrste sekcije *Plethiosphace* (*S. nemorosa*, *S. pratensis*, *S. austriaca*, *S. nutans*, i *S. verbenaca*) (Marin, 1996). Literaturni podaci o karakteristikama orašica *S. amplexicaulis* nisu dostupni. Özkan i dr. (2009) navode tri obrasca skulpturiranosti merikarpa 12 taksona *Salvia* iz Turske: foveatni,

retikularni i verukatni, gde su retikulatne merikarpe posedovale *S. ceratophylla*, *S. virgata*, *S. halophila*, *S. verticillata* subsp. *verticillata* i *S. verticillata* subsp. *amasiaca*. Büyükkartal i dr. (2011) navode da je ornamentacija merikarpa tri endemi ne vrste roda *Salvia* (*S. hedgeana*, *S. huberi*, *S. rosifolia*) druga ija od navedenih - kolikulatna, sa malim brdolikim uzvišenjima. Kahraman i dr. (2011) su našli sva četiri tipa skulpturiranosti u sekciji Hymenospace. Površina orašica dve vrste iz sekcije Aethiopsis (*S. limbata* i *S. palaestina*) je bila glatka do nepravilno naborana (Kahraman i Dogan, 2010).

Prisustvo miksokarpije je jedna od karakteristika koja odvaja Nepetoideae od svih drugih subfamilija familije Lamiaceae (Duleti -Lauševi i Marin, 1999). Produkcija sluzi ima ekološki značaj, jer sluzavi sloj omogućava povoljniju mikroklimu za klijanje semena (Marin, 1996). Orašice proučavane u ovom radu su formirale žu kastu, transparentnu sluz bez fibrila. Miksokarpija sitnijih orašica *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* (sekcija Plethiphace) je zapažena 15 minuta nakon vlaženja, dok je kod krupnijih orašica *S. ringens* (sekcija *Salvia*) merikarp osluznjavao tek nakon 45 minuta. Kod nekih vrsta iz sekcije *Salvia* (*S. glutinosa* i *S. officinalis*) miksokarpija je u potpunosti odsustvovala (Ifrim, 2012). Sitnije orašice proizvode znatno brže znatno veće količine sluzi u odnosu na krupnije (Duleti -Lauševi i Marin, 1999). Međutim, Ifrim (2012) su dobili nešto drugačije rezultate za *S. viridis* ije su relativno krupne orašice ekstremno brzo formirale sluz (za oko 2 minuta nakon kvašenja). Čestice koje proizvode sluz smeštene su u egzokarpu i debljina ovog sloja varira između 13 vrsta roda *Salvia* iz Irana u opsegu 0,25 - 4,24 μm (Habibvash i dr., 2007).

Hedge (1970) grupiše vrste *Salvia* koje proizvode sluz u 4 grupe u odnosu na karakteristike sluzi: sa transparentnom, prozirkom, mlečno neprozirkom i smeđe neprozirkom sluzi. Kod *S. huberi* i *S. rosifolia* sluz se formira nakon prvih pola sata vlaženja; kod *S. hedgeana* tek nakon sat. S obzirom na boju, konzistenciju i stepen transparentnosti, kod ispitivanih vrsta se mogu razlikovati dva tipa sluzi: transparentna sa malo fibrila ili neprozirno mlečno bela sa fibrilima i sa zracima formiranim od sluzi (Büyükkartal i dr., 2011; Ifrim, 2012). U istraživanju dve vrste žalfija, Çelep i dr. (2014) su našli da orašice *S. quezelii* proizvode sluz, dok miksokarpija kod *S. pinnata* odsustvuje, što može poslužiti kao osnova za razlikovanje ovih morfološki veoma sličnih vrsta.

**Polen.** Familija Lamiaceae je 1945. godine na osnovu broja jedara i broja apertura polenovog zrna klasifikovana na Lamioideae (dvojedarni, trikolpatni polen) i Nepetoideae (trojedarni, heksakolpatni polen). Heksakolpatni polen se smatra sinapomorfnim karakterom kod Nepetoideae (Moon i dr., 2008a). Osnovni parametri koji se uzimaju u obzir u palinološkim istraživanjima roda *Salvia* su oblik polenovog zrna, dužina polarne (P) i ekvatorijalne ose (E) i njihov odnos (P/E), dužina i širina kolpi, debljina egzine i intine, kao i obrazac skulpturiranosti egzine polenovog zrna (Moon i dr., 2008a,b; Kahraman i dr., 2010; Kahraman i Dogan, 2010; Özler i dr., 2011).

U ovoj studiji, posmatrana su samo polenova zrna *S. ringens*, gde je uoeno da se formiraju kao pojedina na (monade), da su radijalno simetri na i izopolarna, što je u saglasnosti sa rezultatima studija Moon i dr. (2008b) i Özler i dr. (2011). Dužina polarne ose (P) orašica *S. ringens* iznosi 63,71  $\mu\text{m}$ , a ekvatorijalne ose (E) 45,00  $\mu\text{m}$ . Dužina polarne ose polenovih zrna 30 taksona roda *Salvia* je bila u opsegu 23,0 - 58,6  $\mu\text{m}$ , a ekvatorijalne 26,9 - 66,2  $\mu\text{m}$  (Özler i dr., 2011), dok su Moon i dr. (2008b) našli da veličina polena subtribusa Salviinae varira u opsegu  $P = 20,5\text{--}69,4 \mu\text{m}$  i  $E = 18,4\text{--}72,9 \mu\text{m}$ . Na osnovu rezultata ove studije, oblik polenovog zrna *S. ringens* je prolatni ( $P/E = 1,42$ ). Polen 40 vrsta Salviinae je oblatni do prolatni ( $P/E = 0,73 - 1,43$ ) (Moon i dr., 2008b), dok su najčešći i oblici polenovih zrna vrsta *Salvia* iz Turske suboblatni, subprolatni, oblatno-sferični i prolatno-sferični (Özler i dr., 2011). *S. limbata* i *S. palaestina* su posedovale oblatno-sferična ( $P/E = 0,88$ ), odnosno prolatno-sferična polenova zrna ( $P/E = 1,05$ ) (Kahraman i Dogan, 2010), dok su oblatno-sferična polenova zrna ( $P/E = 0,91$ ) našli i kod *S. chrysophylla* (Kahraman i dr., 2010).

Vrste subtribusa Salviinae poseduju heksakolpatni polen, sa retkim izuzecima kod kojih je uoeno tetra-, penta- i oktakolpatni polen (Moon i dr., 2008b). Polenova zrna *S. ringens* su heksakolpatna, sa simetrično postavljenim kolpama dugim najviše 58,40  $\mu\text{m}$  i mezokolpijumom od 13,65  $\mu\text{m}$ . Polenova zrna 30 taksona roda *Salvia* su heksakolpatna, sa izuzetkom *S. recognita* iz sekcije *Salvia* sa oktakolpatnim polenovim zrnima: dužina kolpi je varirala između 20,2 - 52,8  $\mu\text{m}$ , dok širina mezokolpijuma iznosi od 3,8 do 15,4  $\mu\text{m}$  (Özler i dr., 2011). Heksakolpatna polenova zrna našli i kod *S. limbata*, *S. palaestina*

(Kahraman i Dogan, 2010), *S. willeana*, *S. veneris* (Dereboylu i dr., 2010) i *S. chrysophylla* (Kahraman i dr., 2010b). Ornamentacija egzine tribusa *Menthae* podfamilije *Nepetoideae* je perforatna, mikro- ili biretikulatna; veoma je informativna u sistematskom smislu, naročito na nivou roda (Moon i dr., 2008a). U subtribusu *Salviinae*, ornamentacija je perforatna i još je biretikulatna, naročito kod roda *Salvia* (Moon i dr., 2008b). U ovom radu, ornamentacija egzine *S. ringens* je biretikulatna. Od ukupno 30 analiziranih taksona *Salvia* iz Turske, ovaj tip ornamentacije je bio prisutan kod 10 taksona, dok su druga dva obrasca skulpturiranosti retikulatno-perforatni i retikulatno-granulatni (Özler i dr., 2011). Biretikulatna ornamentaciju je našli i kod endemnih vrsta sa Kipra (*S. willeana* i *S. veneris*) (Dereboylu i dr., 2010). Ornamentacija polenovih zrna *S. limbata*, *S. palaestina* (Kahraman i Dogan, 2010) i *S. chrysophylla* (Kahraman i dr., 2010b) se karakteriše prisustvom pora u biretikulatnoj egzini (biretikulatno-perforatni tip).

**Nektarije.** Nektar igra ključnu ulogu u procesu polinacije kao jedna od najvažnijih nagrada za oprašivača (Petanidou i dr., 2000), a sintetizuje se u specijalizovanim žlezdanim strukturama - nektarijama koje mogu biti smeštene u regionu cveta (floralne) ili na vegetativnim organima (ekstrafloralne) (Fahn, 1988).

U ovoj studiji su analizirane floralne nektarije *S. ringens*, uoči ljuve u obliku prstena u bazi četvororežnjovitog plodnika. Na površini nektarija se uočava epidermis sa modifikovanim stomama za izlivanje nektara (nektarostome). Nektarije biljaka familije *Lamiaceae* su lokalizovane u osnovi četvorokog, nadcvetnog plodnika i najčešće su četvororežnjevite, prstenaste ili u obliku unilateralnog asimetričnog diska (Petanidou i dr., 2000). Kod roda *Salvia* su najčešće prisutne floralne nektarije i to u obliku toralnog, ispupčenog prstena u bazi ovarijuma (Maćukanović-Jocić, 2010; Maćukanović-Jocić i dr., 2012; Zhang i dr., 2014). Floralne nektarije su opisane kod nekoliko vrsta *Salvia*, uključujući i *S. officinalis* (Maćukanović-Jocić i dr., 2012), *S. farinacea* (Zhang i dr., 2014) i dr. Sastoje se od modifikovanog epidermisa (sa ili bez trihoma) i specijalizovanog nektar-prodajućeg parenhima i provodnog tkiva (Fahn, 1988; Maćukanović-Jocić, 2010; Zhang i dr., 2014), koje može biti predstavljeno floemom i ksilemom ili samo floemom (Fahn, 1988). Nektar se izliva na površinu pomoću modifikovanih stoma koje su permanentno

otvorene (Fahn, 1988; Petanidou i dr., 2000; Zhang i dr., 2014). U elijama nektar-produkuju eg parenhima uo avaju se gusta citoplazma i krupna jedra, brojne mitohondrije i plastidi sa skrobnim zrnima (Zhang i dr., 2014), a nektar se izlu uje posredstvom vezikula poreklom od ER ili diktiozoma (Fahn, 1988). U sastav nektara uglavnom ulaze razli iti še eri, uglavnom saharoza i heksoze - glukoza i fruktoza (Fahn, 1988), pri emu u nektaru biljaka familije Lamiaceae dominira saharoza (Petanidou i dr., 2000). U nektaru nekih vrsta *Salvia* dominiraju heksoze (*S. judaica*), a kod nekih drugih saharoza (*S. fruticosa*) (Dafni i dr., 1988).

### 4.2. Hemijski sastav etarskih ulja prou avanih vrsta

Etarska ulja su izolovana hidrodestilacijom nadzemnih delova istraživanih vrsta, a njihov hemijski sastav je ispitan pomo u GC-FID i GC-MS. Rezultati su prezentovani u Tabelama 3-5.

Prinos etarskog ulja *S. amplexicaulis* je bio manji od 0,01 % (0,01 g etarskog ulja/g suvog biljnog materijala). Identifikovano je 52 komponente koje predstavljaju 97,45% ukupnog etarskog ulja. Seskviterpeni su najzastupljenija klasa jedinjenja u etarskom ulju ove biljke, uklju uju i oksidovane seskviterpene (56,54%) i seskviterpenske ugljovodonike (34,60%). Monoterpeni su bili prisutni samo u oksidovanom obliku (5,59%). Kao najzastupljenije komponente ovog ulja izdvajaju se kariofilen oksid (11,34%), germakren D (7,79%), tujopsan-2- -ol (6,69%), germakra-4(15),5,10(14)-trien-1- -ol (5,42%), -kadinol (5,25%), spatulenol (5,08%) i humulen epoksid II (4,95%) (Tabela 3).

Etarsko ulje *S. jurisicii* je pokazalo prinos niži od 0,01% (0,01g EO/g suvog biljnog materijala). Identifikovane su 72 komponente koje predstavljaju 95,56% ulja. Seskviterpeni, sa oksidovanim seskviterpenima (51,24%) i seskviterpenskim ugljovodonicima (23,62%), ine dominantnu grupu terpena u ulju ove biljke. Monoterpenski ugljovodonici i oksidovani monoterpeni su bili zastupljeni u znatno manjim koli inama, 4,05%, odnosno 3,59%. Diterpeni su, u malom procentu (1,87%), bili prisutni samo u oksidovanom obliku. Me u ugljovodonicima, alifati na frakcija je bila znatno

zastupljenija (6,54%) u pore enju sa aromati nim (4,65%). Kao glavne komponente etarskog ulja *S. jurisicii* su okarakterisani spatulenol (12,32%),  $\beta$ -burbonen (6,97%), *n*-nonanal (5,15 %), -murolen (4,78%) i tujopsan-2- -ol (4,54%) (Tabela 4).

**Tabela 3.** Hemijski sastav etarskog ulja *Salvia amplexicaulis*.

Pik br.	Komponenta	RI*	%
1	1-okten-3-ol	983,2	0,42
2	<i>p</i> -cimen	1020,4	0,15
3	1,8-cineol	1026,8	0,33
4	linalol	1099,0	2,55
5	<i>n</i> -nonanal	1102,1	0,16
6	safranal	1190,0	0,33
7	dekanal	1199,3	0,75
8	bornil acetat	1284,1	1,63
9	$\delta$ -elemen	1327,3	0,53
10	-kubeben	1340,0	3,16
11	-ylangene	1361,2	1,44
12	-kopaen	1365,6	1,31
13	$\beta$ -burbonen	1374,5	0,25
14	$\beta$ -elemen	1385,3	0,34
15	<i>cis</i> -kariofilen	1408,4	4,17
16	$\beta$ -cedren	1418,3	1,24
17	- <i>trans</i> -bergamoten	1425,8	0,80
18	$\beta$ -kopaen	1433,4	1,23
19	-humulen	1442,7	0,70
20	<i>trans</i> - $\beta$ -farnezen	1449,5	1,28
21	dauka-5,8-dien	1467,7	3,33
22	germakren D	1471,4	7,79
23	$\beta$ -selinen	1475,8	0,76
24	-gurjunen	1484,6	1,34
25	-murolen	1490,5	0,48
26	-kadinen	1503,8	1,63
27	$\delta$ -kadinen	1513,8	1,70
28	<i>trans</i> -kadina-1,4-dien	1521,8	0,61
29	-kadinen	1527,7	0,39
30	-kalakoren	1533,6	0,11

## Rezultati i diskusija

Tabela 3 (nastavak)

31	<i>trans</i> -longipinokarveol	1542,4	0,90
32	italicen epoksid	1548,2	2,56
33	<i>trans</i> -nerolidol	1558,1	0,43
34	n.i.	1558,9	0,68
35	spatulenol	1571,3	5,08
36	karofilen oksid	1574,1	11,34
37	tujopsan-2- -ol	1585,0	6,96
38	viridiflorol	1593,8	1,51
39	humulen epoksid II	1599,2	4,95
40	n.i.	1605,4	1,05
41	<i>trans</i> -izolongifolanon	1613,4	0,59
42	1-epi-kubenol	1618,7	0,38
43	$\tau$ -kadinol	1633,1	1,61
44	<i>alo</i> -aromadendren epoksid	1641,0	2,05
45	$\tau$ -murolol	1645,8	1,22
46	-kadinol	1647,7	5,25
47	n.i.	1653,0	0,37
48	kadalen	1666,3	2,29
49	mustakon	1670,1	0,87
50	germakra-4(15),5,10(14)-trien-1- -ol	1679,7	5,42
51	n.i.	1695,2	0,45
52	$\beta$ -akoradienol	1755,9	0,56
53	14-oksi- -murolen	1762,2	0,59
54	ciklopentadekanolid	1835,7	1,16
55	<i>cis-cis</i> -farnezil aceton	1868,1	0,63
56	5- <i>trans</i> , 9- <i>trans</i> -farnezil aceton	1908,5	0,18
<b>Grupisane komponente</b>			
<b>Monoterpenski ugljovodonici</b>			0,0
<b>Oksidovani monoterpeni</b>			5,59
<b>UKUPNI MONOTERPENI</b>			<b>5,59</b>
<b>Seskviterpenski ugljovodonici</b>			34,60
<b>Oksidovani seskviterpeni</b>			56,54
<b>UKUPNI SESKVITERPENI</b>			<b>91,14</b>
<b>DRUGE KOMPONENTE</b>			<b>0,72</b>
<b>UKUPNI SADRŽAJ IDENTIFIKOVANIH KOMPONENTI</b>			<b>97,45</b>

\*Retencioni indeks u odnosu na n-alkane na HP-5 kapilarnoj koloni; n.i.- nije identifikovano.

**Tabela 4.** Hemijski sastav etarskog ulja *Salvia jurisicii*.

Pik br.	Komponenta	RI*	%
1	sabinen	970,1	0,37
2	$\beta$ -pinen	972,1	2,62
3	1-okten-3-ol	982,8	1,39
4	mircen	988,8	0,14
5	limonen	1022,8	0,22
6	1,8-cineol	1026,6	0,40
7	-terpinen	1053,4	0,36
8	<i>cis</i> -linalol oksid	1069,3	0,23
9	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dien	1082,1	0,35
10	<i>p</i> -cimenen	1085,5	0,10
11	linalol	1091,7	0,08
12	n-nonanal	1094,5	5,15
13	<i>trans</i> -pinokarveol	1134,3	0,21
14	pinokarvon	1155,8	0,17
15	terpinen-4-ol	1172,4	0,08
16	naftalen	1175,3	0,66
17	-terpineol	1187,0	0,37
18	mirtenal	1189,3	0,57
19	n.i.	1211,2	0,23
20	$\beta$ -ciklocitral	1213,7	0,24
21	neral	1237,3	0,18
22	<i>trans</i> -edulan**	1249,6	0,37
23	n.i.	1253,3	0,25
24	geranial	1267,0	0,20
25	izobornil acetat	1278,2	0,48
26	<i>m</i> -anizil alkohol	1288,6	0,21
27	2,6,10,10-tetrametil-1-oksa-spiro [4,5]dec-6-en	1305,8	0,13
28	-kubeben	1340,3	0,40
29	silfinen	1341,3	0,32
30	silfiperfol-4,7(14)-dien	1343,4	0,31
31	n.i.	1347,1	0,32
32	ciclosativen	1361,5	0,41
33	-kopaen	1366,5	1,83
34	<i>trans-p</i> -ment-6-en-2,8-diol	1371,7	1,71
35	$\beta$ -burbonen	1375,7	6,97
36	$\beta$ -elemen	1383,3	1,94
37	4-(2,2-dimetil-6-metilenecikloheksil)-2-butanon	1389,5	0,40



*Tabela 4 (nastavak)*

38	metil eugenol	1401,5	1,37
39	$\beta$ -funebren	1408,6	0,83
40	$\beta$ -kopaen	1419,0	0,72
41	geranil aceton	1447,8	1,76
42	ciklamen aldehid	1456,9	0,92
43	dauka-5,8-dien	1468,6	1,28
44	-murolen	1472,4	4,78
45	$\beta$ -selinen	1476,4	0,18
46	<i>trans</i> - $\beta$ -jonon	1478,9	0,34
47	-kadinen	1504,3	0,94
48	$\delta$ -kadinen	1514,7	2,14
49	olivetol	1520,7	0,59
50	-kalakoren	1534,1	0,57
51	n.i.	1544,9	0,68
52	silfiperfol-5-en-3-ol A	1549,9	2,80
53	eremopila keton	1556,8	0,80
54	spatulenol	1575,8	12,32
55	aristolen epoksid**	1580,1	2,65
56	leden alkohol	1583,8	0,84
57	tujopsan-2- -ol	1587,6	4,54
58	n.i.	1600,4	0,88
59	aromadendren epoksid	1608,1	4,18
60	<i>cis</i> -izolongifolanon	1615,0	0,48
61	1,10-di-epi-kubenol	1619,9	0,84
62	$\beta$ -cedren-9-one	1627,0	0,37
63	$\tau$ -murolol	1635,0	0,89
64	selina-3,11-dien-6- -ol	1642,9	1,57
65	vulgaron B	1646,7	0,89
66	cedr-8(15)-en-9- -ol	1649,5	2,96
67	epi-zizanon	1654,6	0,27
68	6- <i>cis</i> -pentadecen-2-on	1662,1	2,03
69	germakra-4(15),5,10(14)-trien-1- -ol	1681,6	3,64
70	n.i.	1732,5	0,19
71	$\beta$ -akoradienol	1756,3	0,57
72	14-oksi- -murolen	1762,8	0,36
73	n.i.	1787,7	0,38
74	ciklopentadekanolid	1836,1	0,92
75	sklareoloksid	1869,2	1,47

*Tabela 4 (nastavak)*

<b>76</b>	<i>5-trans,9-trans-farnezil</i> aceton	1908,7	0,35
<b>77</b>	n.i.	1939,8	0,44
<b>78</b>	n.i.	1951,1	0,68
<b>79</b>	n.i.	1973,0	0,39
<b>80</b>	<i>cis-trans-geranil</i> linalol	1998,2	0,35
<b>81</b>	sklareolid	2083,7	1,96
<b>82</b>	abienol	2164,8	1,33
<b>83</b>	labd-7,13-dien-15-ol	2279,2	0,19

**Grupisane komponente**

Alifati ni ugljovodonici	6,54
Aromati ni ugljovodonici	4,65
<b>UKUPNI UGLJOVODONICI</b>	<b>11,19</b>
Monoterpeni ugljovodonici	4,05
Oksidovani monoterpeni	3,59
<b>UKUPNI MONOTERPENI</b>	<b>7,64</b>
Seskviterpeni ugljovodonici	23,62
Oksidovani seskviterpeni	51,24
<b>UKUPNI SESKVITERPENI</b>	<b>74,86</b>
Diterpeni ugljovodonici	0,0
Oksidovani diterpeni	1,9
<b>UKUPNI DITERPENI</b>	<b>1,87</b>
<b>UKUPNI SADRŽAJ IDENTIFIKOVANIH KOMPONENTI</b>	<b>95,56</b>

\*Retencioni indeks u odnosu na n-alkane na HP-5 kapilarnoj koloni; \*\*tentativna identifikacija; n.i.

- nije identifikovano

Etarsko ulje izolovano iz *S. ringens* je bilo žu kaste boje i pokazalo je prinos od 0,19%. Podaci prikazani u Tabeli 5 pokazuju da je od 39 detektovanih komponenti identifikovano 36 komponenti (99,62% ulja). Najzastupljenija grupa terpena su bili monoterpeni (93,60%), ukljujujući i oksidovane monoterpene (56,89%) i monoterpenke ugljenike (36,74%). Ugljovodonici i seskviterpeni su bili zastupljeni u znatno manjim količinama (3,69%, odnosno 2,32%).

Kao glavne komponente etarskog ulja *S. ringens* su se izdvojile 1,8-cineol (31,99%), kampfen (17,06%), borneol (11,94%), -pinen (11,52%), kamfor (5,16%) i bornil acetat (4,52%).

**Tabela 5.** Hemijski sastav etarskog ulja *Salvia ringens*.

Br. pika	Komponenta	RI*	%
1	triciklen	918,8	0,82
2	-tujen	925,3	0,03
3	-pinen	931,0	11,52
4	kamfen	945,3	17,06
5	tuja-2,4(10)-dien	951,1	0,11
6	$\beta$ -pinen	973,2	3,69
7	1-okten-3-ol	986,0	0,73
8	mircen	991,6	3,16
9	-felandren	1003,7	0,11
10	-terpinen	1015,8	0,05
11	<i>p</i> -cimen	1024,5	2,96
12	1,8-cineol	1030,4	31,99
13	<i>cis</i> -tujon	1105,4	0,35
14	1-okten-3-il acetat	1110,4	0,20
15	<i>endo</i> -fenhol	1114,5	0,12
16	$\beta$ -felandren	1122,9	0,19
17	-kamfolenal	1126,6	0,32
18,	<i>trans</i> -pinokarveol	1138,9	0,39
19	kamfor	1142,3	5,16
20	kamfen hidrate	1145,4	0,16
21	borneol	1167,8	11,94
22	terpinen-4-ol	1177,7	1,15
23	-terpineol	1194,0	0,39
24	<i>trans</i> -piperitol	1208,6	0,20
25	bornil acetat	1285,3	4,52
26	-kubeben	1354,0	0,17
27	-kopaen	1367,0	0,31
28	$\beta$ -burbonen	1375,2	0,16
29	<i>cis</i> -kariofilen	1410,0	0,35
30	2-epi- $\beta$ -funebren	1415,5	0,21
31	-humulen	1444,8	0,10
32	9-epi- <i>trans</i> -kariofilen	1450,2	0,13
33	-murolen	1491,2	0,14
34	n.i.	1496,9	0,11
35	n.i.	1500,1	0,16
36	-kadinen	1512,8	0,26
37	n.i.	1509,1	0,11

Tabela 5 (nastavak)

<b>38</b>	<i>trans</i> -kalamenen	1523,2	0,32
<b>39</b>	humulen epoksid II	1608,5	0,16
<b>Grupisane komponente</b>			
	Alifati ni ugljovodonici		0,73
	Aromati ni ugljovodonici		2,96
<b>UKUPNI UGLJOVODONICI</b>			<b>3,69</b>
	Monoterpenski ugljovodonici		36,74
	Oksidovani monoterpeni		56,89
<b>UKUPNI MONOTERPENI</b>			<b>93,60</b>
	Seskviterpenski ugljovodonici		2,16
	Oksidovani seskviterpeni		0,16
<b>UKUPNI SESKVITERPENI</b>			<b>2,32</b>
<b>UKUPNI SADRŽAJ IDENTIFIKOVANIH KOMPONENTI</b>			<b>99,62</b>

\*Retencioni indeks u odnosu na n-alkane na HP-5 kapilarnoj koloni; n.i.- nije identifikovano.

Etarska ulja predstavljaju kompleksne smeše jedinjenja niske molekulske mase, uglavnom terpena i fenolpropanoida, koji su odgovorni za specifičan miris i biološka dejstva etarskih ulja. Najzastupljenije grupe jedinjenja predstavljaju monoterpene, seskviterpene i njihove oksidovane derivate (Raut i Karoppayil, 2014).

Dobijeni rezultati pokazuju da su ulja *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* uglavnom sastavljena od seskviterpena (91,14%, odnosno 74,86%), i to uglavnom oksidovanih koji su u oba slučaja zastupljeni u više od 50% ukupnog ulja (Tabela 3 i 4). Petrović i dr. (2009) i Veličković i dr. (2012) su analizirali hemijski sastav etarskog ulja *S. amplexicaulis* sakupljene sa dva lokaliteta u Srbiji. Kako rezultati ovih istraživanja pokazuju, etarsko ulje ove biljke je bogato seskviterpenima, sa germakrenom D, viridoflorolom, kariofilen oksidom i β-kariofilenom kao dominantnim komponentama. Rzepa i dr. (2009) su pomoću HS-GC-MS (*headspace* gasna hromatografija-masena spektroskopija) kao glavne komponente identifikovali kamfen, β-hamigren i tujol u ulju *S. amplexicaulis* i kamfen, tujol, tujonen i kamfor u ulju *S. jurisicii*.

Sekcija *Plethiosphace* obuhvata 14 vrsta, uključujući i *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* (Hedge, 1972), koje se generalno karakterišu dominacijom seskviterpena u etarskim uljima, sa različitim glavnim komponentama kao što su kariofilen oksid, spatulenol, humulen

epoksid II kod *S. nemorosa* (Malen i dr., 2004), (*E*)-kariofilen, *Z*-farnezen, *epi*-bicikloeskvivelandren i -kubeben u ulju *S. pratensis* (Anakov i dr., 2009), -kariofilen, germakren B, -kariofilen epoksid, spatulenol i germakren D kod *S. virgata* (Sefidkon i dr., 1999) i -felandren, (*E*)-kariofilen i metil ester 6-oktadekanske kiseline u ulju *S. verbenaca* (Pitarokili i dr., 2006).

Rezultati ove studije pokazuju da je seskviterpenski alkohol spatulenol predstavljao dominantnu komponentu ulja *S. jurisicii* (12,32%) i jednu od najzastupljenijih komponenti ulja *S. amplexicaulis* (5,08%). Spatulenol predstavlja veoma moćan spazmolitik (Perez-Hernandez i dr., 2008), pokazuje visoku aktivnost protiv višestruko rezistentnih kliničkih linija kancera (Martins i dr., 2010), kao i snažno imunomodulirajuće sredstvo koje inhibira proliferaciju limfocita i stimulira njihovu apoptozu (Ziaei i dr., 2011).

Najzastupljenija komponenta ulja *S. amplexicaulis*, kariofilen oksid (11,34%), je opisana kao analgetik, antinflamatorni i citotoksični agens (Chavan i dr., 2010; Jun i dr., 2011). Germakren D, također je identifikovan u ulju *S. amplexicaulis* (7,79%), je istaknut kao važan mirisni agens u interakcijama biljaka i insekata (Rostelien i dr., 2000). Birkett i dr. (2008) su pokazali da -burbonen, jedna od glavnih komponenti ulja *S. jurisicii*, deluje kao anti-ektoparazitik.

Za razliku od *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii*, u etarskom ulju *S. ringens* dominantna grupa terpena su bili monoterpeni (93,60%), sa 1,8-cineolom, kamfenom, borneolom, -pinenom, kamforom i bornil acetatom kao glavnim komponentama (Tabela 5). Slično tome, monoterpeni su prepoznati kao dominantna klasa jedinjenja u ulju *S. ringens* sa različitim lokalitetima. Uzorak *S. ringens* iz Grčke je kao dominantne komponente sadržao 1,8-cineol, -pinen, bornil acetat i β-pinen (Tzakou i dr., 2001), varijetet *S. ringens* var. *baldacciana* sa planine Dautica (Makedonija) 1,8-cineol, -pinen i mircen (Šavikin i dr., 2008) i *S. ringens* iz Bugarske kamfor i borneol (Georgiev i dr., 2013). Za razliku od rezultata navedenih studija, uzorak analiziran u ovoj studiji je sadržao prilično visok procenat kamfena (17,06%). Uočene razlike u hemijskom sastavu mogu poticati od više faktora kao što su hemotip, starost biljke, deo biljke iz kog se vrši izolovanje ulja, ekoloških uslova staništa i perioda u kom se obavlja branje biljaka (Ben Farhat i dr., 2009; Miguel, 2010).

*S. ringens* pripada sekciji *Salvia*, u koji je ubrojeno 11 vrsta u Flori Evrope (Hedge, 1972). Neke od ranije istraženih vrsta ove sekcije su tako e bogate monoterpenima, sa razli itim dominantnim komponentama, kao što su  $\alpha$ -tujon, 1,8-cineol,  $\alpha$ -pinen, kamfor i kamfen u ulju *S. officinalis* (Miti - ulafi i dr., 2005; Pierozan i dr., 2009; Stevi i dr., 2014), kamfor, -i -pinen, limonen, 1,8-cineol, -i -tujon u *S. lavandulifolia* (Pierozan i dr., 2009; Stevi i dr., 2014), 1,8-cineol, kamfor, -pinen, mircen, -pinen, -kariofilen i -terpineol u ulju *S. fruticosa* (Topču i dr., 2013; Giweli i dr., 2013).

Neke od glavnih komponenata etarskog ulja *S. ringens*, kao što su 1,8-cineol, - i  $\beta$ -pinen, su opisani kao mo ni antimikrobni agensi u uljima nekih vrsta *Salvia* (Tzakou i dr., 2001; Sonboli i dr., 2006; Šavikin i dr., 2008; Giweli i dr., 2013). Kamfen ispoljava snažno antioksidativno i antinocioceptivno dejstvo (Quintans-Júnior i dr., 2013), i smanjuje nivo holesterola i triglicerida kod hiperlipidemi nih pacova (Vallianou i dr., 2013). Borneol ispoljava antinocioceptivno i antiinflamatorno dejstvo (Almeida i dr., 2013).

Za razliku od *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii*, etarsko ulje *S. ringens* je sadržalo kamfor (5,16%) i *cis*-tujon (0,35%), komponente koje su odgovorne za konvulzivni efekat ulja nekih vrsta na centralni nervni sistem (Millet i dr., 1981). Kamfor i borneol, široko koriš eni u farmaceutskoj i kozmeti koj industriji, su se pokazali toksi nim u nekim slu ajevima mada novije studije pokazuju da ovi terpeni ne pokazuju toksi ne efekte na timocite pacova (Cherneva i dr., 2012).

### 4.3. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima prou avanih vrsta

Ekstrakti nadzemnih delova, listova, stabala i cvasti prou avanih vrsta su dobijeni pomo u pet rastvara a (etanol, voda, metanol, etil acetat, dihlorometan i heksan) kojima su ekstrahovane komponente razli ite polarnosti. Biljni delovi *S. amplexicaulis* su ekstrahovani etanolom i metanolom, *S. jurisicii* 10 - 96% etanolom, a *S. ringens* 96% etanolom, a prinosi dobijenih ekstrakata su prezentovani u Tabelama 6-8.

Vodeni ekstrakti oba uzorka *S. amplexicaulis* su pokazali najve e prinose (>14%), nešto manje etanolni i metanolni ekstrakti, dok su dihlorometanski i etil acetatni ekstrakti

imali višestruko niži prinos (<2%) (Tabela 6). Procenat prinosa varirao je u odnosu na deo biljke korišten za ekstrakciju, gde je najveći prinos imao etanolni ekstrakt cvetova (14,14%), a najniži metanolni ekstrakt stabla (5,92%). Kao što se može videti na osnovu prinosa metanolnih ekstrakata, ekstrakti dobijeni sukcesivnom ekstrakcijom (u tri koraka) nadzemnih delova su pokazali niže prinose (3,86%) u odnosu na ekstrakte dobijene individualnom ekstrakcijom (8,78%).

Etanolni i vodeni ekstrakti nadzemnih delova *S. amplexicaulis* prikupljenih u sezonama A i B su imali veoma slične prinose. Sadržaj ukupnih fenola je bio najveći i u vodenim ekstraktima nadzemnih delova i etanolnom ekstraktu listova *S. amplexicaulis* (>200 mg GAE/g), dok je u dihlorometanskim i heksanskim ekstraktima bio višestruko manji (<40 mg GAE/g). Sadržaj flavonoida je bio najveći i u etil acetatnom ekstraktu nadzemnih delova (75,97 mg QE/g), a najniži u vodenim i metanolnom ekstraktu stabla (<20 mg QE/g) (Tabela 6).

Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida je varirao u ekstraktima različitih biljnih delova *S. amplexicaulis*. Naime, sadržaj fenola je bio najveći i u etanolnom ekstraktu listova (222,40 mg GAE/g) a najmanji u etanolnom ekstraktu cvetova (112,42 mg GAE/g), dok je sadržaj flavonoida bio u opsegu od 15,46 mg QE/g (etanolni ekstrakt stabla) do 49,81 mg QE/g (etanolni ekstrakt listova). Metanolni ekstrakt nadzemnih delova dobijen sukcesivnom ekstrakcijom je sadržao nešto više flavonoida (42,67 mg QE/g) i znatno manje ukupnih fenola (99,11 mg GAE/g) u odnosu na onaj dobijen individualnom ekstrakcijom (38,15 mg QE/g, odnosno 180,89 mg GAE/g). Kao što se može videti u Tabeli 6, ukupni sadržaj fenola i flavonoida u etanolnim i vodenim ekstraktima nadzemnih delova nije značajno varirao u sezonama A i B.

Etanolni i vodeni ekstrakti *S. jurisicii* su imali najveće prinose (kod nekih i iznad 15%), dok je prinos metanolnih, etil acetatnih i dihlorometanskih ekstrakata bio ispod 10% (Tabela 7). Među ekstraktima dobijenim serijom etanola rastu njihova koncentracija najefikasniji rastvarač je bio 50% etanol. Najveći prinos zabeležen je za ekstrakte listova (16,38 - 21,22%), a najniži za ekstrakte stabala (7,44 - 11,52%). Prinosi vodenih i etanolnih ekstrakata uzoraka sakupljenih u sezonama A i B su se značajno razlikovali (9,50% :

17,26%, odnosno 11,18% : 6,52%). Sadržaj fenola u ispitivanim ekstraktima je varirao izme u 35,82 i 144,60 mg GAE/g, dok se sadržaj flavonoida nalazio u opsegu od 9,44 do 41,26 mg QE/g (Tabela 7).

Najve i sadržaj ukupnih fenola je zabeležen u 50% i 96% etanolnim ekstraktima ove biljke (>100 mg GAE/g), dok su manje polarni rastvara i (etil acetat i dihlorometan) najefikasnije ekstrahovali flavonoide (>40 mg QE/g) (Tabela 7). Etanolni ekstrakti stabala su bili najsiromašniji ukupnim fenolima i flavonoidima, a ekstrakti listova najbogatiji, sa izuzetkom 96% etanolnih ekstrakata gde je sadržaj flavonoida bio najviši u nadzemnom delu. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida se uglavnom nije zna ajno razlikovao u uzorcima sakupljenim tokom pra enih sezona sem u slu aju sadržaja ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu koji je bio nešto viši u sezoni A.

Etanolni, metanolni i vodeni ekstrakti *S. ringens* su pokazali viši prinos (>5%) u odnosu na etil acetatni i dihlorometanski ekstrakt (<2,5%) (Tabela 8). Etanolni ekstrakti listova i cvetova su imali ve e prinose (9,10% odnosno 8,42%) u pore enju sa ekstraktom stabala (5,16%). Sadržaji ukupnih fenola i flavonoida su bili najviši u etil acetatnom ekstraktu (248,38 mg GAE/g, odnosno 66,67 mg QE/g), nešto manji u etanolnom ekstraktu listova (226,67 mg GAE/g, odnosno 38,62 mg QE/g), a najniži u dihlorometanskom ekstraktu gde je ukupnih fenola bilo ak 4-5 puta manje (58,10 mg GAE/g).

U pore enju sa drugim biljnim delovima, etanolni ekstrakt listova je bio najbogatiji ukupnim fenolima i flavonoidima (226,67 mg GAE/g, odnosno 38,62 mg QE/g), dok je ekstrakt stabla bio najsiromašniji (128,23 mg GAE/g odnosno 18,69 mg QE/g) (Tabela 8).



**Tabela 6.** Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima *Salvia amplexicaulis*.

Rastavara	Deo biljke (sezona)	Metoda ekstrakcije	Prinos ekstrakta (%)	Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g)	Sadržaj flavonoida (mg QE/g)
<b>Etanol (96%)</b>	nadzemni deo (A)	individulna	13,18	138,05 ± 1,00	27,35 ± 0,60
	listovi (A)	individulna	10,18	222,40 ± 0,64	49,81 ± 0,82
	stablo (A)	individulna	7,52	173,67 ± 1,27	28,77 ± 0,58
	cvasti (A)	individulna	14,14	112,42 ± 0,60	21,85 ± 1,85
	nadzemni deo (B)	individulna	14,01	136,30 ± 1,79	25,77 ± 0,56
<b>Voda</b>	nadzemni deo (A)	individulna	14,32	226,30 ± 1,18	17,87 ± 0,09
	nadzemni deo (B)	individulna	14,26	215,25 ± 1,06	17,54 ± 0,54
<b>Heksan</b>	nadzemni deo (A)	individulna	4,41	34,22 ± 1,35	20,27 ± 0,49
<b>Metanol</b>	nadzemni deo (A)	individulna	8,78	180,89 ± 1,71	38,15 ± 0,97
	listovi (A)	individulna	8,16	154,33 ± 0,85	33,69 ± 0,46
	stabla (A)	individulna	5,92	124,31 ± 1,16	15,46 ± 0,92
	cvasti (A)	individulna	12,00	140,31 ± 0,37	20,59 ± 1,35
	nadzemni deo (B)	sukcesivna	3,86	99,11 ± 0,74	42,67 ± 1,54
<b>Etil acetat</b>	nadzemni deo (B)	sukcesivna	0,87	77,54 ± 1,57	75,97 ± 0,98
<b>Dihlorometan</b>	nadzemni deo (B)	sukcesivna	1,74	37,52 ± 0,51	38,39 ± 0,54

Sezona (A) – biljni materijal sakupljen 2011. godine; sezona (B) - biljni materijal sakupljen 2012. godine

**Tabela 7.** Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima *Salvia jurisicii*.

Rastavara	Deo biljke (sezona)	Metoda ekstrakcije	Prinos ekstrakta (%)	Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g)	Sadržaj flavonoida (mg QE/g)
<b>Etanol (10%)</b>	listovi (A)	individualna	18,88	82,97 ± 1,00	13,77 ± 0,33
	stabla (A)	individualna	8,56	35,82 ± 0,80	9,44 ± 0,16
	nadzemni deo (A)	individualna	15,06	79,10 ± 0,31	13,05 ± 0,35
<b>Etanol (30 %)</b>	listovi (A)	individualna	19,85	99,34 ± 0,67	16,67 ± 0,31
	stabla (A)	individualna	9,76	89,13 ± 0,15	11,59 ± 0,35
	nadzemni deo (A)	individualna	17,38	92,60 ± 0,40	16,10 ± 0,19
<b>Etanol (50 %)</b>	listovi (A)	individualna	21,22	141,55 ± 1,90	19,85 ± 0,28
	stabla (A)	individualna	11,52	106,97 ± 1,10	13,38 ± 0,54
	nadzemni deo (A)	individualna	19,03	119,07 ± 0,60	17,79 ± 0,23
<b>Etanol (96 %)</b>	listovi (A)	individualna	16,38	144,60 ± 1,18	27,87 ± 0,47
	stabla (A)	individualna	7,44	119,02 ± 0,71	20,77 ± 0,41
	nadzemni deo (A)	individualna	11,18	127,71 ± 0,92	29,55 ± 0,55
	nadzemni deo (B)	individualna	6,52	82,97 ± 0,14	30,18 ± 0,39
<b>Voda</b>	nadzemni deo (A)	individualna	9,50	81,03 ± 0,22	32,36 ± 0,73
	nadzemni deo (B)	individualna	17,26	82,69 ± 0,54	32,00 ± 0,41
<b>Heksan</b>	nadzemni deo (A)	individualna	3,11	42,85 ± 1,64	18,26 ± 0,92
<b>Metanol</b>	nadzemni deo (B)	sukcesivna	6,69	55,74 ± 1,24	21,56 ± 0,49
<b>Etil acetat</b>	nadzemni deo (B)	sukcesivna	4,38	80,89 ± 1,87	40,41 ± 0,85
<b>Dihlorometan</b>	nadzemni deo (B)	sukcesivna	2,16	61,45 ± 0,38	41,26 ± 0,51

Sezona (A) – biljni materijal sakupljen 2011. godine; sezona (B) – biljni materijal sakupljen 2012. godine

**Tabela 8.** Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima *Salvia ringens*.

<b>Rastavara</b>	<b>Deo biljke (sezona)</b>	<b>Metoda ekstrakcije</b>	<b>Prinos ekstrakta (%)</b>	<b>Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g)</b>	<b>Sadržaj flavonoida (mg QE/g)</b>
<b>Etanol (96 %)</b>	listovi (B)	individualna	9,10	226,67 ± 1,58	38,62 ± 0,67
	stabla (B)	individualna	5,16	128,23 ± 1,35	18,69 ± 0,68
	cvetovi (B)	individualna	8,42	202,75 ± 1,77	31,97 ± 0,56
	nadzemni deo (B)	individualna	7,20	208,27 ± 1,11	30,41 ± 0,64
<b>Voda</b>	nadzemni deo (B)	individualna	6,50	189,01 ± 0,70	22,64 ± 0,90
<b>Metanol</b>	nadzemni deo (B)	sukcesivna	6,94	185,05 ± 1,47	27,31 ± 0,59
<b>Etil acetat</b>	nadzemni deo (B)	sukcesivna	1,37	248,38 ± 0,46	66,67 ± 1,46
<b>Dihlorometan</b>	nadzemni deo (B)	sukcesivna	2,39	58,10 ± 0,51	32,31 ± 0,43

Sezona (B) - biljni materijal sakupljen 2012. godine

Prinos ekstrakata prou avanih vrsta varirao je u opsegu od 0,88 kod etil-acetatnog ekstrakta nadzemnih delova *S. amplexicaulis* do 9,10% kod 96% etanolnog ekstrakta listova *S. ringens*) (Tabele 6-8). Ovako široko variranje prinosa ekstrakata se može pripisati razlikama u hemijskom sastavu biljnih vrsta i biljnih delova, vrsti rastvarača, ekstrakcionim procedurama i sezonama prikupljanja biljnog materijala. Prinos 165 ekstrakata 55 vrsta roda *Salvia* poreklom iz Turske je bio u opsegu od 0,14% do 13,41% u zavisnosti od vrste i rastvarača (enol i dr., 2010). Ekstrakti listova i cvetova tri prou avane vrste su imali najveće prinose, nešto manje ekstrakti nadzemnog dela biljke, a najmanje ekstrakti stabla. Slične rezultate saopštili su i Veliković i dr. (2003) za etanolne ekstrakte *S. officinalis*, naime najveći i prinos su imali ekstrakti cvetova (3,50%), nešto manji ekstrakti listova (3,10%), a najmanji ekstrakti stabla (1,20%). Fiore i dr. (2006) su zabeležili prinose metanolnih ekstrakata 6 vrsta roda *Salvia* poreklom iz Jordana koji su bili u opsegu od 118,00 mg/g do 183,00 mg/g, i istakli da su prinosi ekstrakata listova i nadzemnih delova bili najveći. Do sličnih rezultata došli su i Stanković i dr. (2010) analizirajući i metanolne i vodene ekstrakte *Teucrium chamaedrys*, gde su metanolni i vodeni ekstrakti nadzemnog dela i listova imali najveći i prinos.

U našoj studiji najveći i procenat prinosa izmeren je za vodene i etanolne ekstrakte svih prou avanih vrsta, za kojima su sledili metanolni, a zatim heksanski, dihlormetanski i etil acetatni ekstrakti. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija gde su ekstrakti dobijeni nepolarnim i manje polarnim rastvaračima pokazali niži procenat prinosa u odnosu na one dobijene alkoholom ili vodom (Akkol i dr., 2008; enol i dr., 2010; Stanković i dr., 2010; Orhan i dr., 2007, 2012). Naime, Orhan i dr. (2012) su zabeležili prinose metanolnog i etil acetatnog ekstrakta *S. amplexicaulis* poreklom iz Turske (3,05% odnosno 2,79%) koji su slični prinosima ekstrakata *S. amplexicaulis* prou avane u ovoj studiji.

Na prinos ekstrakata uticala je i koncentracija rastvarača, tj. najveći i prinosi ekstrakata dobijeni su korišćenjem 30% i 50% etanola. Kako pokazuju rezultati Nasri (2012), prinos ekstrakta je rastao sa povećanjem koncentracije etanola i dostizao maksimum primenom 70 - 80% etanola nakon čega je naglo opadao. Da je prinos

ekstrakcije binarnim sistemom rastvara a (alkohol/voda) viši od prinosa ekstrakcije samo jednim od njih (alkohol ili voda) pokazale su i brojne druge studije (Durling i dr., 2007; Cvetkovikj i dr., 2013; Dent i dr., 2013). Pérez-Bonilla i dr. (2013) su saopštili zavisnost prinosa ekstrakata od sezone uzorkovanja, Ben Farhat i dr. (2013a, 2014) od lokaliteta i fenološke faze, a Spigno i De Faveri (2007) od ekstrakcione procedure.

Sadržaj ukupnih fenola je bio najviši u ekstraktima *S. ringens* (58,10-248,38 mg GAE/g), nešto niži u ekstraktima *S. amplexicaulis* (34,22-226,30 mg GAE/g) i najniži u ekstraktima *S. jurisicii* (35,82 - 144,60 mg GAE/g), dok je sadržaj flavonoida opadao od ekstrakata *S. amplexicaulis* (15,46 - 75,97 mg QE/g), preko ekstrakata *S. ringens* (18,59 - 66,77 mg QE/g) do ekstrakata *S. jurisicii* (9,44 - 41,26 mg QE/g). Ekstrakti *S. ringens* analizirani u ovom radu su imali znatno viši sadržaj ukupnih fenola i flavonoida od metanolnih ekstrakata cvetova *S. ringens* poreklom iz Bugarske (Nikolova, 2011). Naši rezultati su u saglasnosti sa onima dobijenim od strane Tusevski i dr. (2014) koji su, analiziraju i sadržaj polifenola u metanolnim ekstraktima 27 lekovitih biljaka sakupljenih na planini Gali ici (Makedonija), našli da je ekstrakt *S. ringens* bio me u najbogatijim ukupnim fenolima i flavonoidima.

Sli no rezultatima naše studije, Muráriková i dr. (2015) su izmerili 2-3 puta viši sadržaj ukupnih fenola, posebno ruzmarinske kiseline, u metanolnom ekstraktu *S. amplexicaulis* u odnosu na iste ekstrakte *S. jurisicii* kultivisane na dva lokaliteta u eškoj, dok su Sajewicz i dr. (2012) zabeležili nešto viši sadržaj flavonoida u ekstraktu *S. jurisicii* nego u ekstraktu *S. amplexicaulis* sakupljenih u Poljskoj. Sadržaji ukupnih fenola i flavonoida u našim uzorcima su sli ni onima u etanolnim ekstraktima 14 vrsta roda *Salvia* iz Turske (57,10 - 218,09 mg GAE/g, odnosno 8,29 - 108,78 mg QE/g) (Orhan i dr., 2013), kao i u metanolno-hloroformskim ekstraktima 16 vrsta ovog roda poreklom iz Južne Afrike (45,00 - 211,00 mg GAE/g) (Kamatou i dr., 2010), ali mnogo više nego u metanolnim ekstraktima 8 vrsta iz Turske (50,30 - 101,20 mg GAE/g) (Tosun i dr., 2009).

Dobijeni rezultati pokazuju da su vodeni, etanolni i u manjoj meri metanolni ekstrakti najbogatiji ukupnim fenolima što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Akkol i dr., 2008; Ko ar i dr., 2011; Stagos i dr., 2012), a da su etil acetatni ekstrakti bogati

flavonoidima što je u skladu sa rezultatima Orhan i dr. (2012) koji su pokazali da je etil acetatni ekstrakt *S. amplexicaulis* poreklom iz Turske sadržao više flavonoida (58,40 mg QE/g) nego metanolni ekstrakt (10,12 mg QE/g).

Iako se u literaturi navode razliiti odnosi etanola i vode u mešavinama za ekstrakciju (Chew i dr., 2011; Wendakoon i dr., 2012; Dent i dr., 2013), rezultati ove studije pokazuju da je najefikasniji ekstraktant totalnih fenola i flavonoida iz biljnog materijala 96% etanol. Durling i dr. (2007) i Cvetkovikj i dr. (2013) su istakli da se korišćenjem binarnog sistema rastvarača, koji se sastoji iz 55 - 75% etanola ili metanola u vodi, postiže najveća efikasnost u ekstrahovanju polifenola iz biljnog materijala.

Sadržaji ukupnih fenola i flavonoida su bili najviši u ekstraktima nadzemnih delova i listova, za kojim slede ekstrakti cvetova i stabala. Ovi rezultati su u skladu sa onim koje su Stanković i dr. (2010) saopštili za *Teucrium chamaedriss*. Naime, najviši sadržaj ukupnih fenola izmeren je u vodenim, metanolnim i acetonskim, a flavonoida u acetonskim i etil acetatnim ekstraktima nadzemnih delova i listova. U slučaju *S. amplexicaulis*, metanolni ekstrakti različitih delova su sadržali nešto više polifenola u odnosu na etanolne što se poklapa sa rezultatima Sultana i dr. (2009) koji su našli viši sadržaj polifenola u metanolnim, pre svega u 80% metanolnim, nego u etanolnim ekstraktima nekih lekovitih biljaka.

U slučaju etanolnih i vodenih ekstrakata *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* uočene su neznatne ili male razlike u sadržaju ukupnih fenola i flavonoida u dve uzastopne sezone A i B, što je u skladu sa literaturnim podacima za *S. fruticosa* (Dinçer i dr., 2012), *S. tomentosa* (Dinçer i dr., 2013) i *S. officinalis* (Ben Farhat i dr., 2014).

#### 4.4. HPLC analiza fenolnih komponenti proučavanjih vrsta

Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih komponenti pet različitih ekstrakata (dihlorometanski, etil acetatni, metanolni, etanolni i vodeni) tri vrste roda *Salvia* je izvršena pomoću tehnike hromatografije (HPLC-DAD). Komponente su klasifikovane na osnovu

Bolton i dr. (2008) i Neveu i dr. (2010), sadržaj svake komponente je izražen u procentima i rezultati su prezentovani u Tabelama 9-11.

Analizom ekstrakata *S. amplexicaulis* je identifikovano ukupno 18 komponenti koje su klasifikovane u tri glavne klase fenolnih jedinjenja: fenolne kiseline, flavonoidi (uključujući i flavone i flavonole) i ostali polifenoli. Po broju identifikovanih polifenola ekstrakti su rangirani kao metanolni > vodeni i etil acetatni > etanolni > dihlorometanski, a prema sadržaju identifikovanih komponenti metanolni > etanolni > vodeni > etil acetatni > dihlorometanski (Tabela 9).

Me u fenolnim kiselinama su naime kafena i ružmarinska kiselina. Kafena kiselina je bila prisutna u metanolnom, etanolnom i vodenom ekstraktu u opsegu 0,21 - 2,78%, dok je ružmarinska kiselina naime u vodenom (6,70%) i metanolnom (3,92%) ekstraktu. Sadržaj flavonskih aglikona je bio najviši u etil acetatnom ekstraktu, dok su glikozidi flavona u najvećem meri bili prisutni u vodenom i alkoholnim ekstraktima. Luteolin 5-*O*-glukozid je identifikovan kao najzastupljenija komponenta među flavonima, naročito u metanolnom ekstraktu (23,78%). Flavonoli su procentualno bili zastupljeniji u odnosu na flavone, pri čemu je njihov procenat u alkoholnim i vodenom ekstraktu iznosio više od 40%. Kempferol 3-*O*-(6''-*O*-acetilglukozid)-7-*O*-ramnozid i ostali glikozidi kempferola su bili dominantni među flavonolima, posebno u etanolnom (63,61%), a zatim metanolnom i vodenom ekstraktu. Među ostalim polifenolima, kumarin je bio prisutan samo u etil acetatnom i dihlorometanskom ekstraktu (3,00%, odnosno 2,94%).

Kako pokazuju rezultati analize fenolnih komponenti, ekstrakti *S. jurisicii* sadrže ukupno 17 komponenti klasifikovanih kao fenolne kiseline, flavonoidi (uključujući i flavone i flavonole) i ostali polifenoli (Tabela 10). Ekstrakti dobijeni primenom različitih rastvarača se razlikuju po broju i sadržaju identifikovanih komponenti, pri čemu su raspoređeni (od najvećeg ka najmanjem): metanolni > etanolni > etilacetatni > vodeni > dihlorometanski (prema broju identifikovanih komponenti), metanolni > vodeni > etanolni > etil acetatni > dihlorometanski (prema procentu identifikovanih komponenti).

Galna kiselina (u metanolnom i etanolnom ekstraktu) i kafena kiselina (samo u metanolnom ekstraktu) su bile prisutne u veoma malom procentu (ispod 0,50%). Ekstrakti

su sadržali nešto više flavonola (sem u metanolnom ekstraktu). Me u flavonima, metanolni ekstrakt je bio bogat glikozidima luteolina (posebno luteolin 5-*O*-(6''-*O*-malonilglukozida, 7,41%). Vodeni ekstrakt je sadržao viši procenat glikozida genkvanina, od kojih je genkvanin 5-*O*-(6''-*O*-malonilglukozid identifikovan u svim ekstraktima, sa najvišim procentom u metanolnom (7,30%). Me u flavonolima je identifikovano nekoliko glikozida kempferola (<5%). Glikozidi kvercetina su bili više zastupljeni u vodenim i alkoholnim ekstraktima, sa izuzetkom hiperozida koji je u najvećem procentu identifikovan u dihlormetanskom i etil acetatnom ekstraktu (9,13%, odnosno 7,37%). Kumarin je bio prisutan samo u etil acetatnom ekstraktu (1,61%).

Na osnovu dobijenih rezultata analize fenolnih komponenti, može se videti da ekstrakti *S. ringens* sadrže 17 fenolnih komponenti, klasifikovanih kao fenolne kiseline, flavonoidi (uključujući i flavone i flavonole) i ostali polifenoli. Broj i sadržaj fenolnih komponenti varira u zavisnosti od korišćenog rastvarača, pa su po broju identifikovanih komponenti ekstrakti raspoređeni u nizu (od najvećeg ka najmanjem): metanolni > etil acetatni > etanolni > vodeni > dihlormetanski, a prema njihovom sadržaju kao metanolni > vodeni > etanolni > etil acetatni > dihlormetanski (Tabela 11).

Galna kiselina i ruzmarinska kiselina su bile prisutne samo u metanolnom ekstraktu *S. ringens* (0,05%, odnosno 3,59%). Kafena kiselina je identifikovana u svim ekstraktima sem dihlormetanskog, sa najvećim sadržajem u vodenom ekstraktu (8,27%). Flavonoli su bili prisutni u većem procentu u odnosu na flavone, naročito u vodenom i alkoholnim ekstraktima, gde su činili oko 60% ukupno identifikovanih komponenti. Analizirani ekstrakti su u najvećem procentu sadržali flavonolni glikozid kempferol 3-*O*-(6''-*O*-acetilglukozid)-7-*O*-ramnozid, posebno u vodenom i etanolnom ekstraktu (48,19%, odnosno 46,46%). Najviši procenat hiperozida je kvantifikovan u dihlormetanskom ekstraktu. Me u ostalim polifenolima, kumarin je bio prisutan u etil acetatnom, etanolnom i posebno metanolnom ekstraktu sa sadržajem 1,35 - 2,90%.



**Tabela 9.** HPLC analiza fenolnih komponenti *Salvia amplexicaulis*

Komponenta (%)	Ekstrakti*				
	DHM	ETAC	MEOH	ETOH	V
<b>FENOLNE KISELINE</b>					
1 Kafena kiselina	-	-	0,21	0,48	2,78
2 Ruzmarinska kiselina	-	-	3,92	-	6,70
<b>FLAVONOIDI</b>					
<b>Flavoni</b>					
3 Apigenin	-	0,62	0,19	-	-
4 Apigenin 5- <i>O</i> -glukozid**	-	-	3,74	-	-
5 Apigenin 4'- <i>O</i> -glukozid**	-	-	6,06	-	1,07
6 Genkwanin 5- <i>O</i> -glukozid**	-	-	3,43	0,86	-
7 Genkwanin 5- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -malonilglukozid)**	1,45	-	0,13	-	-
8 Genkwanin 4'- <i>O</i> -glukozid**	-	0,09	0,13	-	-
9 Luteolin	-	1,28	-	-	-
10 Luteolin 5- <i>O</i> -glukozid**	-	-	23,78	13,75	3,12
<b>Flavonoli</b>					
11 Kempferol 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -malonilglukozid)- 7- <i>O</i> -glukozid malonilglukozid)-7- <i>O</i> -glukozid**	-	2,29	8,20	-	1,19
12 Kempferol 3- <i>O</i> glukozid-7- <i>O</i> -ramnozid**	-	-	5,03	-	-
13 Kempferol 3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -acetilglukozid)-7- <i>O</i> -ramnozid**	-	1,52	29,84	63,61	41,03
14 Kempferol 3- <i>O</i> - ramnozid**	-	-	0,52	-	-
15 Kempferol 7- <i>O</i> - ramnozid**	-	-	0,22	-	1,37
16 Rutin**	-	-	5,80	0,98	-
17 Hiperozid**	5,42	5,48	0,08	0,60	-
<b>OSTALI POLIFENOLI</b>					
18 Kumarin	2,94	3,00	-	-	-
<b>UKUPAN SADRŽAJ FENOLNIH KISELINA</b>	-	-	4,13	0,48	9,48
<b>UKUPAN SADRŽAJ FLAVONIDA</b>	6,87	11,28	87,15	79,80	47,78
<b>Ukupan sadržaj flavona</b>	1,45	1,99	37,46	14,61	4,19
<b>Ukupan sadržaj flavonola</b>	5,42	9,29	49,69	65,19	43,59
<b>UKUPAN SADRŽAJ OSTALIH POLIFENOLA</b>	2,94	3,00	-	-	-
<b>UKUPAN SADRŽAJ IDENTIFIKOVANIH KOMPONENTI (%)</b>	<b>9,81</b>	<b>14,28</b>	<b>91,28</b>	<b>80,28</b>	<b>57,26</b>
<b>BROJ IDENTIFIKOVANIH KOMPONENTI</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>16</b>	<b>6</b>	<b>7</b>

\*Za pripremu ekstrakata su korišćeni nadzemni delovi biljaka sakupljenih 2012. godine (sezona B); \*\*tentativna identifikacija; DHM - dihlorometanski, ETAC - etil acetatni, MEOH - metanolni, ETOH - etanolni, V - vodeni;

Tabela 10. HPLC analiza fenolnih komponenti *Salvia jurisicii*.

Komponente (%)	Ekstrakti*				
	DHM	ETAC	MEOH	ETOH	V
<b>FENOLNE KISELINE</b>					
1 Galna kiselina	-	-	0.16	0.14	-
2 Kafena kiselina	-	-	0.38	-	-
<b>FLAVONOIDI</b>					
<b>Flavoni</b>					
3 Apigenin	-	2.15	-	-	-
4 Luteolin 5-O-glukozid**	-	-	4.35	1.86	-
5 Luteolin 5-O-(6''-O-malonilglukozid)**	-	-	7.41	3.96	0.82
6 Genkvanin 5-O-glukozid**	-	-	2.36	1.92	1.59
7 Genkvanin 5-O-(6''-O-malonilglukozid)**	0.04	2.41	2.62	3.09	7.30
8 Genkvanin 4'-O-glukozid**	-	3.26	-	-	-
<b>Flavanoli</b>					
9 Kempferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)-7-O-glukozid**	-	-	0,52	-	2,98
10 Kempferol 3-O-soforozid**	-	0,10	-	-	-
11 Kempferol 3-O-(6''-O-acetilglukozid)-7-O-ramnozid**	-	0,45	2,45	-	-
12 Kempferol 3-O glukozid**	-	-	1,54	1,62	-
13 Kempferol 7-O-ramnozid**	-	-	2,05	2,35	3,49
14 Kvercetin	-	0,08	5,10	3,29	4,95
15 Kvercetin 3,7-O-diglukozid**	-	-	0,42	0,30	4,53
16 Hiperozid**	9,13	7,37	2,82	5,80	-
<b>OSTALI POLIFENOLI</b>					
17 Kumarin	-	1,61	-	-	-
<b>UKUPAN SADRŽAJ FENOLNIH KISELINA</b>	-	-	0,54	0,14	-
<b>UKUPAN SADRŽAJ FLAVONIDA</b>	9,17	15,82	31,64	24,19	25,66
<b>Ukupan sadržaj flavona</b>	0,04	7,82	16,74	10,83	9,71
<b>Ukupan sadržaj flavonola</b>	9,13	8,00	14,90	13,36	15,95
<b>UKUPAN SADRŽAJ OSTALIH POLIFENOLA</b>	-	1,61	-	-	-
<b>UKUPAN SADRŽAJ IDENTIFIKOVANIH KOMPONENTI (%)</b>	<b>9,17</b>	<b>17,43</b>	<b>32,18</b>	<b>24,33</b>	<b>25,66</b>
<b>BROJ IDENTIFIKOVANIH KOMPONENTI</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>7</b>

\*Za pripremu ekstrakata su korišteni nadzemni delovi biljaka sakupljenih 2012. godine (sezona B); \*\*tentativna identifikacija; DHM - dihlorometanski, ETAC - etil acetatni, MEOH - metanolni, ETOH - etanolni, V - vodeni;

**Tabela 11. HPLC analiza fenolnih komponenti *Salvia ringens*.**

Komponente (%)		Ekstrakti*				
		DHM	ETAC	MEOH	ETOH	V
<b>FENOLNE KISELINE</b>						
1	Galna kiselina	-	-	0,05	-	-
2	Kafena kiselina	-	0,18	0,51	1,28	8,27
3	Metiletar kafene kiseline**	-	-	0,30	-	-
4	Ruzmarinska kiselina	-	-	3,59	-	-
<b>FLAVONOIDI</b>						
<b>Flavoni</b>						
5	Apigenin	-	1,64	0,13	1,32	-
6	Apigenin 5- <i>O</i> -glukozid**	-	-	3,31	-	-
7	Apigenin 4'- <i>O</i> -glukozid**	-	0,03	1,71	-	1,40
8	Genkvanin 5- <i>O</i> -glukozid**	-	1,39	-	-	-
9	Luteolin	-	2,68	0,60	2,21	-
<b>Flavonoli</b>						
10	Kempferol 3- <i>O</i> -7- <i>O</i> -diglukozid**	-	1,18	-	-	-
11	Kempferol 3- <i>O</i> -glukozid-7- <i>O</i> -ramnozid**	-	-	1,67	-	-
12	Kempferol 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -acetilglukozid)-7- <i>O</i> -ramnozid**	-	12,00	28,71	46,46	48,19
13	Kempferol 3- <i>O</i> -ramnozid**	-	0,71	0,20	-	-
14	Rutin**	-	0,25	17,31	7,74	8,54
15	Kvercetin	-	1,44	-	-	-
16	Hiperozid**	12,81	2,64	5,99	2,83	-
<b>OSTALI POLIFENOLI</b>						
17	Kumarin	-	1,35	2,90	1,72	-
<b>UKUPAN SADRŽAJ FENOLNIH KISELINA</b>		-	0,18	4,45	1,28	8,27
<b>UKUPAN SADRŽAJ FLAVONIDA</b>		12,81	23,96	59,63	60,56	58,13
<b>Ukupan sadržaj flavona</b>		-	5,74	5,75	3,53	1,40
<b>Ukupan sadržaj flavonola</b>		12,81	18,22	53,88	57,03	56,73
<b>UKUPAN SADRŽAJ OSTALIH POLIFENOLA</b>		-	1,35	2,90	1,72	-
<b>UKUPAN SADRŽAJ IDENTIFIKOVANIH</b>		<b>12,81</b>	<b>25,49</b>	<b>66,98</b>	<b>63,56</b>	<b>66,39</b>
<b>KOMPONENTI (%)</b>						
<b>BROJ IDENTIFIKOVANIH KOMPONENTI</b>		<b>1</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>7</b>	<b>4</b>

\*Za pripremu ekstrakata su korišćeni nadzemni delovi biljaka sakupljenih 2012. godine (sezona B); \*\*tentativna identifikacija; DHM - dihlorometanski, ETAC - etil acetatni, MEOH - metanolni, ETOH - etanolni, V - vodeni;

Ekstrakti analiziranih vrsta žalfija sadržali su tri glavne grupe polifenola: fenolne kiseline, flavonoide (uključujući i flavone i flavonole) i ostale polifenole. Prema broju i ukupnom sadržaju identifikovanih komponenti, najviše polifenola su sadržali metanolni, zatim vodeni i etanolni, i na kraju etil acetatni i dihlorometanski ekstrakti, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija na više vrsta žalfija (Akkol i dr., 2008; Ko ar i dr., 2011; Orhan i dr., 2012; Kontogianni i dr., 2013), koje su pokazale da sadržaj ekstrahiranih polifenola raste sa povećanjem polarosti rastvarača (Akkol i dr., 2008; Orhan i dr., 2012). Međutim, rezultati prethodnih studija su pokazali da je broj i prinos ekstrahiranih polifenolnih komponenti žalfija bio manji prilikom ekstrakcije jednim od rastvarača (alkohol ili voda), nego mešavinom rastvarača (alkohol/voda), jer se na taj način postiže ekstrakcija komponenta šireg spektra polarosti (Durling i dr., 2007; Cvetković i dr., 2013; Dent i dr., 2013). Naime, najveća efikasnost ekstrakcije fenolnih kiselina, flavonoida i derivata diterpena iz ekstrakata 108 uzoraka žalfija iz Južne Evrope je postignuta korišćenjem ultrazvučnog kupatila, 70% metanola i 70% etanola i temperature od 40 °C (Cvetković i dr., 2013).

Ukupni sadržaj identifikovanih polifenolnih komponenti je bio najviši u ekstraktima *S. amplexicaulis* (9,81 - 91,28%), zatim u ekstraktima *S. ringens* (12,81 - 66,98%) i *S. jurisicii* (9,17 - 32,18%). U prethodnim studijama je saopšteno da je sadržaj polifenola varirao u zavisnosti od vrste (Kamatou i dr., 2010; Coisin i dr., 2012), uslova staništa i fenoloških faza (Ben Farhat i dr., 2013a, 2014), sezona prikupljanja materijala (Dinçer i dr., 2012), kao i u ekstraktima različitih delova jedne iste biljke (Li i dr., 2015).

Među fenolnim kiselinama, istraživane vrste su sadržale kafenu, ružmarinsku i galnu kiselinu, i to uglavnom u metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima. Kafena kiselina je bila prisutna kod sve tri vrste žalfija, sa najvećim sadržajem u ekstraktima *S. ringens* (0,18 - 8,27%), što je u skladu sa Kamatou i dr. (2010) koji su izmerili sadržaj kafeine kiseline u metanolnim ekstraktima 16 vrsta žalfija ispod 10%. Kafena i ružmarinska kiselina su pronađene u vodeno-metanolnom ekstraktu *S. ringens* u koncentracijama od 0,05%, odnosno 4,33% (Zupkó i dr., 2001).

U ovoj studiji, ruzmarinska kiselina je bila prisutna kod *S. amplexicaulis* i *S. ringens* sa sadržajem manjim 10%, što je u skladu sa rezultatima koje su saopštili Zupkó i dr. (2001), Li et al. (2015) i Muráriková i dr. (2015). Kod *S. jurisicii* ova kiselina nije detektovana, iako je ranije pronađena u metanolnim ekstraktima ove biljke kultivisane u Poljskoj (Sajewicz i dr., 2011) i češkoj (Murarikova i dr., 2015). Ruzmarinska kiselina je najčešći i derivat kafeinske kiseline u porodici Lamiaceae (Lu i Foo, 2002) i najzastupljenija fenolna kiselina vrsta roda *Salvia* (Lu i Foo, 2000; Kamatou i dr., 2005, 2010; Akkol i dr., 2008; Ben Farhat i dr., 2009, 2013a, 2014; Kocar i dr., 2011; Askun i dr., 2012; Dinçer i dr., 2012; Orhan i dr., 2012; Coisin i dr., 2012; Li i dr., 2015).

Uzorci *S. jurisicii* kultivisane u Poljskoj su u najvećem procentu sadržali hlorogensku, a zatim ruzmarinsku i kafeinsku kiselinu, dok galna kiselina nije detektovana (Sajewicz i dr., 2011). Orhan i dr. (2012) su identifikovali osam fenolnih kiselina u metanolnom i etil acetatnom ekstraktu *S. amplexicaulis* iz Turske, uključujući i kafeinsku i ruzmarinsku kiselinu. Spektrofotometrijski određeni sadržaj ruzmarinske kiseline je bio trostruko viši u metanolnom ekstraktu *S. amplexicaulis* kultivisane u češkoj u odnosu na isti ekstrakt *S. jurisicii* (Muráriková i dr., 2015). Metanolni ekstrakt *S. ringens* iz Rumunije sadržao je 20 - 100 puta više ruzmarinske kiseline u odnosu na kafeinsku, p-kumarnu i hlorogensku kiselinu (Coisin i dr., 2012). Galna kiselina je detektovana u ekstraktima *S. jurisicii* i *S. ringens* u veoma niskom procentu (<0,2%), što je u skladu sa rezultatima za pojedine vrste žalfija iz Turske (Akkol i dr., 2008; Kocar i dr., 2011; Dinçer i dr., 2012).

U našem istraživanju, ekstrakti su sadržali 2 - 10 puta više u količini flavonola u odnosu na flavone, za razliku od istraživanja Kharazian (2013, 2014) koji je kao dominantnu klasu flavonoida iranskih vrsta žalfija istakao flavone. Lee i dr. (2011a) su pokazali da acetonski ekstrakti testiranih vrsta žalfija sadrže 1,5 - 3 puta niži sadržaj flavona u odnosu na ekstrakte lavande, ruzmarina i bosiljka.

Među flavonima su identifikovani apigenin, luteolin, genkvanin i njihovi glikozidi koji su i ranije opisani kao glavne flavonske komponente ekstrakata žalfija (Lu i Foo, 2002; Akkol i dr., 2008; Kocar i dr., 2011; Coisin i dr., 2012; Ibrahim, 2012). Flavonski aglikoni su bili najčešći i u etil acetatnom ekstraktu, a njihovi glikozidi u vodenom i alkoholnim

ekstraktima, kao što je pokazano za luteolin i luteolin glikozid u ekstraktima turskih vrsta žalfija (Akkol i dr., 2008; Ko ar i dr., 2011). Apigenin je detektovan kod svih vrsta, ali njegovi glikozidi nisu detektovani kod *S. jurisicii*, kao ni luteolin. Luteolin glikozidi su bili eš i od aglikona, naro ito luteolin 5-*O*-glukozid u ekstraktima *S. amplexicaulis* (3,12 - 23,78%). Genkvanin glikozidi su bili prisutni kod ekstrakata sve tri vrste, sa najve om zastupljenoš u u ekstraktima *S. jurisicii* (0,04 - 7,30%).

U ekstraktima sve tri vrste žalfija, naro ito alkoholnim i vodenim, najzastupljeniji flavonoli su bili kempferol glikozidi. Me u njima, kempferol 3-*O*-(6''-*O*-acetilglukozid)-7-*O*-ramnozid bio je prisutan u pojedinim ekstraktima *S. amplexicaulis* i *S. ringens* sa približno 30-60%. Kempferol nije detektovan u ekstraktima 16 vrsta *Salvia* iz Južne Afrike (Kamatou i dr., 2010), za razliku od ekstrakata *S. fruticosa* (Dinçer i dr., 2012), dok su njegovi glikozidi identifikovani u iranskim vrstama žalfija (Kharazian, 2013, 2014).

U ekstraktima testiranih vrsta su identifikovani kvercetin i njegovi glikozidi, uklju uju i hiperozid i rutin. Kvercetin je uglavnom bio prisutan u vodenom i metanolnom ekstraktu *S. jurisicii* sa udelom do 5%, a sli an procenat je izmeren ranije u ekstraktima žalfija (Dinçer i dr., 2012; Ibrahim, 2012; Kharazian, 2014), dok je u nekim uzorcima žalfija potpuno odsustvovao (Askun i dr., 2012). Hiperozid je detektovan kod svih prou avanih vrsta (0,08 - 12,87%), uglavnom u dihlormetanskim, a zatim etil acetatnim i metanolnim ekstraktima sa najve im procentom u ekstraktima *S. ringens*. Sli no hiperozidu, neki glikozidi su ranije na eni u ve im koli inama u nepolarnim u pore enju sa polarnim rastvara ima, kao što je rutin hidrat u hloroformskim ekstraktima nekih vrsta Lamiaceae (Askun i dr., 2012). Rutin je identifikovan u alkoholnim i vodenim ekstraktima *S. amplexicaulis* i posebno *S. ringens* iji je metanolni ekstrakt sadržao najviši procenat ovog glikozida (17,31%). Ovaj glikozid je detektovan ranije u metanonlim ekstraktima *S. fruticosa* (Dinçer i dr., 2012), dostižu i maksimalan sadržaj u etil acetatnim ekstraktima nekih vrsta *Salvia* (Askun i dr., 2012).

Literaturni podaci o flavonoidima istraživanih vrsta dostupni su za *S. ringens*, gde su Nikolova i dr. (2006) detektovali površinske flavone i flavonole u eksudatu listova bugarske *S. ringens*. U metanolnom ekstraktu ove biljke iz Rumunije detektovani su

luteolin, apigenol i apigenin-7 glukozid, dok luteolin glukozidi nisu detektovani (Coisin i dr., 2012), kao ni u našoj studiji. S druge strane, Sajewicz i dr. (2011) nisu pronašli luteolin i kempferol u uzorcima kultivisane *S. jurisicii*.

Lu i Foo (2002) među najčešćim flavonskim konstituentima žalfija navode apigenin i luteolin, kao i njihove derivate, uključujući i apigenin 7-metiletar (genkvanin), dok su flavonolni derivati uglavnom izvedeni iz kempferola i kvercetina. Generalno, flavonoidi identifikovani u ekstraktima žalfija u ovoj studiji uključujući i apigenin, luteolin, genkvanin, kempferol, kvercetin i njihove glikozide su opisani kao konstituenti ekstrakata mnogih vrsta *Salvia* (Lu i Foo, 2002; Akkol i dr., 2008; Askun i dr., 2009; Ben Farhat i dr., 2009, 2013a, 2014; Kamatou i dr., 2010; Koar i dr., 2011; Ibrahim, 2012; Kontogianni i dr., 2013).

Među ostalim polifenolima u svim vrstama je detektovan kumarin (3,00%), i to u svim tipovima ekstrakata sem vodenog. Kumarin je u niskom sadržaju nađen i u metanolnim ekstraktima *S. jurisicii* kultivisane u Poljskoj, kao i skopoletin (Sajewicz i dr., 2011). U ekstraktima nekih vrsta *Salvia* su detektovani eskuletin, herniarin i sagekumarin (Lu i Foo, 2002). Među acetonskim ekstraktima 28 vrsta porodice Lamiaceae, Lee i dr. (2011a) su izmerili najviši sadržaj kumarina u ekstraktima nekoliko vrsta žalfija (90,80 µg/mg), odnosno 9,08%.

#### 4.5. Antioksidativna aktivnost etarskog ulja i ekstrakata proučavanih vrsta

Antioksidativna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata istraživanih vrsta *Salvia*, kao i komercijalnih antioksidanasa (BHA, BHT i askorbinska kiselina) je merena pomoću četiri testa: DPPH, ABTS, FRAP i β-karoten/linolna kiselina (β-CB) test (Tabele 12-14).

Vodeni, pojedini metanolni i etanolni ekstrakti *S. amplexicaulis* su pokazali jaču aktivnost u odnosu na BHT (17,94 µg/mL) u DPPH testu, posebno metanolni ekstrakt nadzemnog dela u sezoni B (15,09 µg/mL). Aktivnosti etil acetatnog, heksanskog i dihlormetanskog ekstrakta su bile i do 40 puta slabije (196,51 - 593,19 µg/mL). Etanolni, vodeni i metanolni ekstrakti (u koncentraciji od 1 mg/mL) su pokazali naj snažniju ABTS aktivnost (iznad 2,00 mg AAE/g), blisku vrednosti antioksidanasa BHA i BHT (u

koncentraciji 0,1 mg/mL). Etil acetatni, heksanski i dihlormetanski ekstrakti su pokazali znatno nižu aktivnost (ispod 1,00 mg AAE/g). FRAP vrednosti ekstrakata (0,50 mg/mL) su varirale od 112,39 za etil acetatni do 1406,73  $\mu\text{mol Fe(II)/g}$  za vodeni ekstrakt uzorka sezone A. U  $\beta$ -CB testu, vodeni i etanolni ekstrakt su inhibirali oksidaciju  $\beta$ -karotena sa efikasnoš u od približno 40% (Tabela 12).

Porede i ekstrakate razli itih delova *S. amplexicaulis*, uo ava se da su etanolni ekstrakti generalno ispoljili ja u DPPH aktivnost u odnosu na metanolne. Me u njima, etanolni ekstrakt listova se pokazao kao najefikasniji antioksidans (16,07  $\mu\text{g/mL}$ ), za kojim slede ekstrakti stabla, nadzemnog dela i cvasti.

Vodeni ekstrakti nadzemnih delova sezone A su pokazali ja u antioksidativnu aktivnost u odnosu na one iz sezone B. Što se ti e etanolnih ekstrakata nadzemnih delova dve sezone, DPPH aktivnost se nije zna ajno razlikovala. Metanolni ekstrakt nadzemnih delova sezone B koji je dobijen sukcesivnom ekstrakcijom se pokazao kao efikasniji hvata DPPH slobodnih radikala u odnosu na metanolni ekstrakt nadzemnih delova sezone A dobijen individualnom ekstrakcijom.

U DPPH testu, etanolni ekstrakti *S. jurisicii*, posebno oni dobijeni 50% i 96% etanolom, su pokazali najja u aktivnost (<125,00  $\mu\text{g/mL}$ ), za kojima su sledili metanolni i vodeni ekstrakti. Metanolni i pojedini 50% i 96% etanolni ekstrakti su se pokazali najefikasnijim u ABTS testu sa vrednostima iznad 1,50 mg AAE/g. Metanolni ekstrakt nadzemnih delova biljaka sakupljenih u sezoni B se izdvojio naro ito visokom FRAP vrednoš u (476,22  $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ ) u odnosu na druge ekstrakte (<300  $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ ). U  $\beta$ -CB testu su etanolni i vodeni ekstrakti pokazali sli an procenat inhibicije oksidacije  $\beta$ -karotena (oko 40%), dok je metanolni ekstrakt pokazao znatno slabiju aktivnost. U pore enju sa pomenutim ekstraktima, heksanski, etil acetatni i dihlormetanski ekstrakti su pokazali višestruko slabiju antioksidativnu aktivnost u svim testovima. Imaju i u vidu testirane koncentracije, ekstrakti *S. jurisicii* su pokazali slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na komercijalne antioksidanse BHA, BHT i askorbinsku kiselinu (Tabela 13)..

U DPPH testu,  $\text{IC}_{50}$  vrednosti etanolnih ekstrakata celih nadzemnih delova i odvojenih listova i stabala *S. jurisicii* su bile u opsegu 95,81-246,39  $\mu\text{g/mL}$ .



Najaktivnijim u eliminisanju DPPH radikala su se pokazali etanolni ekstrakti celih nadzemnih delova, naročito 50% (95,81 µg/mL) i 96% (97,10 µg/mL), za kojima su sledili ekstrakti listova i stabala. Etanolni ekstrakt listova (96%) je pokazao najviše vrednosti u ABTS testu (1,76 mg AAE/g), dok su ostali etanolni ekstrakti u odnosu na ABTS aktivnost bili rangirani kao 50% > 30% > 10% i listovi > nadzemni delovi > stabla.

Porede i sezone A i B, može se primetiti da je vodeni ekstrakt *S. jurisicii* sakupljene u sezoni B pokazao snažniji antioksidativni kapacitet u DPPH i ABTS testu. U slučaju 96% etanolnih ekstrakata nadzemnih delova, uzorak sezone A je pokazao nešto jaču aktivnost u DPPH testu, a uzorak sezone B u ABTS testu.

DPPH aktivnost ekstrakata *S. ringens* izmerena je u opsegu IC<sub>50</sub> vrednosti od 17,26 µg/mL (etanolni ekstrakt) do 266,22 µg/mL (dihlorometanski ekstrakt) (Tabela 14). Usled veoma niskog prinosa, antioksidativna aktivnost etarskog ulja je izmerena samo DPPH testom, gde je ulje ispoljilo ekstremno slabiju aktivnost u odnosu na ekstrakte (IC<sub>50</sub> 654,33 µg/mL). Nasuprot metanolnom i dihlormetanskom ekstraktu, etanolni, vodeni i metanolni ekstrakti su ispoljili snažnu ABTS aktivnost (iznad 2 mg AAE/g) blisku vrednostima BHA i BHT na 10 puta nižoj koncentraciji. Slično tome, najviše FRAP vrednosti su izmerene za etanolni ekstrakt (1088,30 µmol Fe(II)/g), a najniže za dihlormetanski ekstrakt (191,13 µmol Fe(II)/g). U β-CB testu je najveći procenat inhibicije izmeren za etanolni ekstrakt (84,04%), koji je bio viši nego u slučaju komercijalnih antioksidanasa (17,82 - 57,71%).

U odnosu na DPPH aktivnost, etanolni ekstrakti cele biljke i različitih delova mogu biti rangirani (od najjačeg ka najslabijem): nadzemni deo > cvetovi > listovi > stabla, a u ABTS testu kao cvetovi > listovi > nadzemni deo > stabla. Etanolni ekstrakt nadzemnog dela biljke je pokazao nešto jaču aktivnost (17,26 µg/mL) u odnosu na komercijalni antioksidans BHT (17,94 µg/mL).

**Tabela 12.** Antioksidativna aktivnost ekstrakata *Salvia amplexicaulis*.

Ekstrakt/ standard	Deo biljke (sezona)	Metoda ekstrakcije	DPPH test (IC <sub>50</sub> , µg/mL)	ABTS test (mg AAE/g)	FRAP test (µmol Fe(II)/g)	β-CB test (% inhibicije)
Etanolni (96 %)	nadzemni deo (A)	individualna	28,74 ± 0,96	nt	nt	nt
	listovi (A)	individualna	16,07 ± 0,04	nt	nt	nt
	stabla (A)	individualna	22,53 ± 0,14	nt	nt	nt
	cvasti (A)	individualna	32,29 ± 0,46	nt	nt	nt
	nadzemni deo (B)	individualna	27,80 ± 0,36	2,82 ± 0,01 <sup>a</sup>	979,36 ± 9,75 <sup>b</sup>	40,43 ± 0,92 <sup>b</sup>
Vodeni	nadzemni deo (A)	individualna	14,21 ± 0,33	2,91 ± 0,02 <sup>a</sup>	1406,73 ± 8,06 <sup>b</sup>	nt
	nadzemni deo (B)	individualna	15,83 ± 0,08	2,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	1372,71 ± 8,66 <sup>b</sup>	41,76 ± 1,13 <sup>b</sup>
Metanolni	nadzemni deo (A)	individualna	21,28 ± 0,06	nt	nt	nt
	listovi (A)	individualna	23,27 ± 0,08	nt	nt	nt
	stabla (A)	individualna	26,08 ± 0,19	nt	nt	nt
	cvasti (A)	individualna	28,42 ± 0,24	nt	nt	nt
	nadzemni deo (B)	sukcesivna	15,09 ± 0,44	2,44 ± 0,02 <sup>a</sup>	1178,90 ± 7,30 <sup>b</sup>	13,30 ± 1,84 <sup>b</sup>
Heksanski	nadzemni deo (A)	individualna	335,76 ± 17,94	0,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	nt	nt
Etil acetatni	nadzemni deo (B)	sukcesivna	196,51 ± 4,61	0,69 ± 0,02 <sup>a</sup>	112,39 ± 3,69 <sup>b</sup>	nt
Dihlorometanski	nadzemni deo (B)	sukcesivna	593,19 ± 14,92	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	116,97 ± 7,95 <sup>b</sup>	nt
BHT	/	/	17,94 ± 0,17	2,75 ± 0,02 <sup>c</sup>	445,34 ± 7,77 <sup>c</sup>	57,71 ± 3,39 <sup>b</sup>
BHA	/	/	13,37 ± 0,43	2,82 ± 0,01 <sup>c</sup>	583,72 ± 5,26 <sup>c</sup>	53,72 ± 2,26 <sup>b</sup>
Askorbinska kiselina	/	/	5,11 ± 0,14	nt	180,81 ± 8,61 <sup>c</sup>	17,82 ± 1,13 <sup>b</sup>

Sezona (A) – biljni materijal sakupljen 2011. godine; sezona (B) - biljni materijal sakupljen 2012. godine; koncentracija uzorka: <sup>a</sup>1 mg/mL; <sup>b</sup>0.5 mg/mL; <sup>c</sup>0.1 mg/mL; nt-nije testirano

**Tabela 13.** Antioksidativna aktivnost ekstrakata *S. jurisicii*.

Ekstrakt/ standard	Deo biljke (sezona)	Metoda ekstrakcije	DPPH test (IC <sub>50</sub> , µg/mL)	ABTS test (mg AAE/g)	FRAP test (µmol Fe(II)/g)	β-CB test (% inhibicije)
Etanolni (10%)	Listovi (A)	individualna	210,19 ± 1,11	1,23 ± 0,03 <sup>a</sup>	nt	nt
	Stabla (A)	individualna	246,39 ± 1,22	0,77 ± 0,01 <sup>a</sup>	nt	nt
	Nadzemni deo (A)	individualna	176,48 ± 1,24	0,98 ± 0,01 <sup>a</sup>	nt	nt
Etanolni (30%)	Listovi (A)	individualna	131,39 ± 1,01	1,46 ± 0,03 <sup>a</sup>	nt	nt
	Stabla (A)	individualna	131,13 ± 1,18	1,14 ± 0,02 <sup>a</sup>	nt	nt
	Nadzemni deo (A)	individualna	112,27 ± 0,77	1,29 ± 0,05 <sup>a</sup>	nt	nt
Etanolni (50%)	Listovi (A)	individualna	113,10 ± 0,91	1,65 ± 0,02 <sup>a</sup>	nt	nt
	Stabla (A)	individualna	106,82 ± 0,89	1,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	nt	nt
	Nadzemni deo (A)	individualna	95,81 ± 0,63	1,42 ± 0,04 <sup>a</sup>	nt	nt
Etanol (96%)	Listovi (A)	individualna	125,36 ± 0,38	1,76 ± 0,01 <sup>a</sup>	nt	nt
	Stabla (A)	individualna	100,64 ± 0,21	1,35 ± 0,02 <sup>a</sup>	nt	nt
	Nadzemni deo (A)	individualna	97,10 ± 0,20	1,51 ± 0,02 <sup>a</sup>	nt	nt
	Nadzemni deo (B)	individualna	134,31 ± 0,25	1,60 ± 0,03 <sup>a</sup>	279,44 ± 8,45 <sup>b</sup>	39,36 ± 2,26 <sup>b</sup>
Vodeni	Nadzemni deo (A)	individualna	212,24 ± 0,92	1,15 ± 0,06 <sup>a</sup>	290,14 ± 6,88 <sup>b</sup>	nt
	Nadzemni deo (B)	individualna	163,45 ± 0,70	1,34 ± 0,06 <sup>a</sup>	277,14 ± 8,61 <sup>b</sup>	29,79 ± 1,27 <sup>b</sup>
Heksanski	Nadzemni deo (A)	individualna	419,23 ± 4,08	0,12 ± 0,03 <sup>a</sup>	nt	nt
Metanolni	Nadzemni deo (B)	sukcesivna	148,69 ± 1,19	1,70 ± 0,03 <sup>a</sup>	476,22 ± 10,15 <sup>b</sup>	14,36 ± 1,84 <sup>b</sup>
Etil acetatni	Nadzemni deo (B)	sukcesivna	550,78 ± 7,03	0,74 ± 0,03 <sup>a</sup>	100,92 ± 2,95 <sup>b</sup>	nt
Dihlorometanski	Nadzemni deo (B)	sukcesivna	1243,38 ± 23,65	0,43 ± 0,04 <sup>a</sup>	148,32 ± 3,50 <sup>b</sup>	nt
BHT	/	/	17,94 ± 0,17	2,75 ± 0,02 <sup>c</sup>	445,34 ± 7,77 <sup>c</sup>	57,71 ± 3,39 <sup>b</sup>
BHA	/	/	13,37 ± 0,43	2,82 ± 0,01 <sup>c</sup>	583,72 ± 5,26 <sup>c</sup>	53,72 ± 2,26 <sup>b</sup>
Askorbinska kiselina	/	/	5,11 ± 0,14	nt	180,81 ± 8,61 <sup>c</sup>	17,82 ± 1,13 <sup>b</sup>

Sezona (A) – biljni materijal sakupljen 2011. godine; sezona (B) - biljni materijal sakupljen 2012. godine; koncentracija uzorka: <sup>a</sup>1 mg/mL; <sup>b</sup>0.5 mg/mL; <sup>c</sup>0.1 mg/mL; nt-nije testirano

**Tabela 14.** Antioksidativna aktivnost etarskog ulja i ekstrakata *S. ringens*.

Uzorak/ standard	Deo biljke (sezona)	Metoda ekstrakcije	DPPH test (IC <sub>50</sub> , µg/mL)	ABTS test (mg AAE/g)	FRAP test (µmol Fe(II)/g)	β-CB test (% inhibicije)
Etanolni (96 %)	Listovi (B)	individualna	24,17 ± 0,27	2,87 ± 0,01 <sup>a</sup>	nt	nt
	Stabla (B)	individualna	50,88 ± 0,82	2,06 ± 0,02 <sup>a</sup>	nt	nt
	Cvetovi (B)	individualna	20,98 ± 0,99	2,92 ± 0,01 <sup>a</sup>	nt	nt
	Nadzemni deo (B)	individualna	17,26 ± 0,41	2,44 ± 0,03 <sup>a</sup>	1088,30 ± 17,66 <sup>b</sup>	84,04 ± 4,22 <sup>b</sup>
Vodeni	Nadzemni deo (B)	individualna	23,44 ± 0,31	2,42 ± 0,02 <sup>a</sup>	615,44 ± 6,72 <sup>b</sup>	73,40 ± 4,02 <sup>b</sup>
Metanolni	Nadzemni deo (B)	sukcesivna	20,29 ± 0,26	1,19 ± 0,03 <sup>a</sup>	274,85 ± 13,19 <sup>b</sup>	21,28 ± 1,84 <sup>b</sup>
Etil acetatni	Nadzemni deo (B)	sukcesivna	22,25 ± 0,57	2,36 ± 0,03 <sup>a</sup>	969,80 ± 25,24 <sup>b</sup>	nt
Dihlorometanski	Nadzemni deo (B)	sukcesivna	266,22 ± 4,21	0,58 ± 0,02 <sup>a</sup>	191,13 ± 11,02 <sup>b</sup>	nt
Etarsko ulje	Nadzemni deo (B)	/	654,33 ± 6,52	nt	nt	nt
BHT	/	/	17,94 ± 0,17	2,75 ± 0,02 <sup>c</sup>	445,34 ± 7,77 <sup>c</sup>	57,71 ± 3,39 <sup>b</sup>
BHA	/	/	13,37 ± 0,43	2,82 ± 0,01 <sup>c</sup>	583,72 ± 5,26 <sup>c</sup>	53,72 ± 2,26 <sup>b</sup>
Askorbinska kiselina	/	/	5,11 ± 0,14	nt	180,81 ± 8,61 <sup>c</sup>	17,82 ± 1,13 <sup>b</sup>

Sezona (B) - biljni materijal sakupljen 2012. godine; koncentracija uzorka: <sup>a</sup>1 mg/mL; <sup>b</sup>0,5 mg/mL; <sup>c</sup>0,1 mg/mL; nt - nije testirano

Na osnovu izloženih rezultata može se primetiti da je antioksidativna aktivnost ekstrakata tri vrste žalfija varirala u zavisnosti od rastvarača, dela biljke koji se koristi za ekstrakciju, izbora ekstrakcione metode, sezone prikupljanja materijala, kao i testa za evaluaciju antioksidativne aktivnosti.

Generalno, vodeni i alkoholni (etanolni i metanolni) ekstrakti svih analiziranih biljaka su pokazali višestruko jače antioksidativno dejstvo u odnosu na etil acetatne, dihlorometanske i heksanske ekstrakte, sa izuzetkom etil acetatnog ekstrakta *S. ringens* čija je antioksidativna aktivnost veoma bliska aktivnostima vodenih i alkoholnih ekstrakata u primenjenim testovima, što je u skladu sa rezultatima studije *S. halophila* (Korarić dr., 2011). Ekstrakti 55 vrsta *Salvia* dobijeni sukcesivnom ekstrakcijom, korišćenom i u ovom radu, su pokazali se po aktivnosti u DPPH testu rangirali kao metanolni > etil acetatni > dihlorometanski (enol dr., 2010). Ekstrakti dobijeni 50% etanolom su efikasnije redukovali DPPH· i ABTS<sup>+</sup> radikale u odnosu na one dobijene 96% etanolom ili istom vodom. Dodavanjem vode u ekstrakcionu smešu alkohol/voda se povećava polarnost ekstraktanta (Tiwari dr., 2011), što je potvrđeno ranijim studijama na lekovitim biljkama (Sultana dr., 2009; Chew dr., 2011; Emanuel dr., 2011; Lee dr., 2011b). Fenolne komponente ekstraktibilne u polarnoj frakciji poseduju grupe koje ih čine polarnim i koje doniraju elektrone (posebno hidroksilne grupe) u *o*- ili *p*- položaju. Takav položaj im omogućava da lakše interaguju sa slobodnim radikalima, odnosno da ispolje antioksidativnu aktivnost (Tepe, 2008).

Mada su rezultati varirali u zavisnosti od vrste i korišćenog rastvarača, ekstrakti celih nadzemnih delova i ekstrakti listova su generalno pokazali veći antioksidativni kapacitet u odnosu na ekstrakte stabala i cvetova. Slične varijacije su ranije opisane u studijama roda *Teucrium* (Stanković dr., 2010, 2011a). Rezultati nekoliko studija grupe autora iz Tunisa (Ben Farhat dr., 2009, 2013a,b,c, 2014, 2015) ukazuju da antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata nekoliko vrsta žalfija, merena DPPH, ABTS i FRAP testom, varira zavisno od lokaliteta i fenološke faze u kojoj je prikupljen biljni materijal.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti biljaka, uključujući i mnogobrojne vrste roda *Salvia*, se najčešće vrši paralelnom primenom više testova kako bi se dobila potpunija slika

o antioksidativnom dejstvu, što umnogome otežava pore enje dobijenih rezultata (Pizzale i dr., 2002). Sem toga, autori koriste razli ite varijante istog testa i veoma heterogene na ine prezentovanja rezultata, što u zna ajnoj meri otežava njihovu komparaciju.

U ovom radu, rezultati DPPH testa su prezentovani kao  $IC_{50}$  vrednost koja predstavlja koncentraciju uzorka koja neutrališe 50% po etne koncentracije DPPH· radikala, odnosno redukuje 50% boje rastvora DPPH (Molyneux, 2004). Iako je  $IC_{50}$  vrednost naj eš e koriš eni na in predstavljanja rezultata ovog testa, neki autori predstavljaju DPPH aktivnost kao procenat inhibicije DPPH· radikala u prisustvu uzorka odre ene koncentracije (Orhan i dr., 2012, 2013). Ekstrakti testiranih vrsta ispoljili su sposobnost da redukuju DPPH· radikale sa  $IC_{50}$  vrednostima izme u 14,21 - 1243,38  $\mu\text{g/mL}$ . Neki od ekstrakata su ispoljili ja u DPPH aktivnost od komercijalnog antioksidansa BHT (17,94  $\mu\text{g/mL}$ ) kao što su pojedini etanolni, vodeni i metanolni ekstrakti *S. amplexicaulis* i jedan etanolni ekstrakt *S. ringens* sa  $IC_{50}$  vrednostima od 14,21 do 17,26  $\mu\text{g/mL}$ , ali ipak nisu bili aktivniji od komercijalnih antioksidanasa BHA (13,37  $\mu\text{g/mL}$ ) i askorbinske kiseline (5,11  $\mu\text{g/mL}$ ). Etarsko ulje *S. ringens* je ispoljilo znatno nižu DPPH aktivnost u odnosu na ekstrakte ove biljke, što je u saglasnosti sa rezultatima studija Kamatou i dr. (2005) i Kivrak i dr. (2009).

Pore enjem testiranih vrsta zapaža se da ekstrakti *S. amplexicaulis* ispoljavaju naj snažnju DPPH aktivnost, za kojima slede ekstrakti *S. ringens*, dok su najmanje aktivni bili ekstrakti *S. jurisicii*. U prethodnom istraživanju vrsta roda *Salvia* iz Turske (Orhan i dr., 2012), metanolni ekstrakt *S. amplexicaulis* je pokazao viši procenat inhibicije DPPH radikala (28,13%) u odnosu na etil acetatni ekstrakt (11,18%). Sli no rezultatima dobijenim u ovom radu, studije koje su obuhvatile nekoliko vrsta žalfija gajenih u Ma arskoj pokazuju da je metanolni ekstrakt *S. ringens* ispoljio zna ajnu antioksidativnu aktivnost (Zupkó i dr., 2001), a ekstrakt *S. jurisicii* veoma slabu (Janicsák i dr., 2010). Ekstrakti samonikle *S. ringens*, prikupljeni u Gr koj (Couladis i dr., 2003), Bugarskoj (Nikolova, 2011) i Makedoniji (Tusevski i dr., 2014), pokazali su snažno antioksidativno dejstvo u više primenjenih testova, uklju uju i DPPH test.

Rezultati ove studije su u skladu sa prethodnim studijama kojima su obuhvaeni ekstrakti velikog broja vrsta *Salvia* iz Turske, Irana, Grčke, Tunisa i Južnoafričke Republike, a koje pokazuju širok opseg  $IC_{50}$  vrednosti od  $<5,00$  do  $>500,00$   $\mu\text{g/mL}$  (Tepe, 2008; Kamatou i dr., 2010; Tosun i dr., 2010; Stagos i dr., 2012; Ben Farhat i dr., 2013a, 2014, 2015; Firuzi i dr., 2013).

Sli no rezultatima ove studije, Sultana i dr. (2009) su mere i antioksidativnu aktivnost ekstrakata nekoliko lekovitih biljaka zaklju ili da rezultati DPPH testa zavise od rastvara a, procedure i dela biljke upotrebljenog za ekstrakciju. Ekstrakti razli itih delova testiranih biljaka su ispoljili razli it potencijal da neutrališu DPPH· radikal, što je u skladu sa rezultatima istraživanja DPPH aktivnosti listova i korenova *S. miltiorhiza*, *S. przewalskii* i *S. verticillata* (Matkowski i dr., 2008b).

Rezultati ABTS testa su u nekim slu ajevima predstavljani pomo u  $IC_{50}$  vrednosti (Kamatou i dr., 2007, 2010; Stagos i dr., 2012), mada je mnogo eš e izražavanje preko ekvivalenata standarda, kao što su Trolox (Re i dr., 1999) i askorbinska kiselina (Kim i Lee., 2002). U ovom radu je za izradu standardne krive koriš ena askorbinska kiselina (vitamin C), koja redukuje  $ABTS^+$  katjon sa vrednoš u 1,05 mM ekvivalenata Trolox- a (TE), pri emu je reakcija zavisna od koncentracije, ali nezavisna od vremena reakcije (Re i dr., 1999). Galna kiselina, kvercetin, epikatehin i katehin efikasnije redukuju  $ABTS^+$  radikal od askorbinske kiseline, dok su Trolox, hlorogenska kiselina i rutin bili znatno manje efikasni (Kim i Lee, 2002).

Ekstrakti testirani u ovom radu su pokazali sposobnost da redukuju  $ABTS^+$  katjon sa vrednostima od 0,12 do 2,92 mg AAE/g. Ove vrednosti su uporedive sa aktivnoš u komercijalnih antioksidanasa BHA (2,82 mg AAE/g) i BHT (2,75 mg AAE/g), koji su testirani u 10 puta nižoj koncentraciji u odnosu na ekstrakte, pa je aktivnost ekstrakata ocenjena kao slabija od aktivnosti ovih antioksidanasa. Najsnažniju ABTS aktivnost su ispoljili ekstrakti *S. ringens*, zatim *S. amplexicaulis*, a najslabiju ekstrakti *S. jurisicii*. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa studijom Tusevski i dr. (2014) koji su, testiraju i ekstrakte 27 lekovitih biljaka prikupljenih u Makedoniji ABTS testom, istakli aktivnost *S. ringens* u ABTS testu (809,60  $\mu\text{M TE/g}$  suve težine).

Rezultati testiranja drugih vrsta *Salvia* ABTS testom su veoma hetegoreni i uglavnom prezentovani u ekvivalentima Trolox-a (TE). Metanolni ekstrakti nekoliko vrsta žalfija iz Tunisa su neutralisali ABTS<sup>+</sup> radikal sa vrednostima u opsegu od 100 - 800  $\mu\text{M}$  TE/mg (Ben Farhat i dr., 2009, 2013a,b,c, 2014, 2015). Kako pokazuju pojedine od prethodnih studija, ABTS aktivnost žalfija zavisi od dela biljke i rastvara a koji se koristi za ekstrakciju. Ekstrakti dve iranske vrste žalfija, *S. urmiensis* i *S. hydrangea* su pokazale vrednosti 0,30 - 7,80  $\mu\text{M}$  TE/g, pri emu su najviše vrednosti dobijene za metanolne i etil acetatne ekstrakte, a najniže za heksanske ekstrakte ovih biljaka (Bahadori i Mirzaei, 2015). Ekstrakti listova tri vrste žalfija gajenih u Poljskoj su pokazali znatno višu ABTS aktivnost (9,25 - 15,60 mg TE/g) u odnosu na ekstrakte korenova (6,07 - 12,50 mg TE/g) (Matkowski i dr., 2008b).

FRAP test se uobi ajeno, kako je predloženo u originalnoj proceduri (Benzie i Strain, 1996), izražava preko standardne krive za Fe(II). U FRAP testu, ekstrakti su redukovali Fe(III) u Fe(II) u opsegu vrednosti od 100,92 do 1406,73  $\mu\text{mol}$  Fe(II)/g. Aktivnost ekstrakata, testirana na petostruko višoj koncentraciji, je bila uporediva sa aktivnoš u komercijalnih antioksidanasa (180,81 - 583,72  $\mu\text{mol}$  Fe (II)/g). Ekstrakti *S. amplexicaulis* i *S. ringens* su pokazali znatno ja u antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte *S. jurisicii*.

Testiranjem metanolnih ekstrakata nekoliko vrsta žalfija iz Tunisa FRAP testom dobijen je opseg vrednosti od 81,56 do 197,33 mmol Fe (II)/mg (Ben Farhat i dr., 2009, 2013a,b,c, 2014, 2015), koje su bile više od vrednosti dobijenih u ovom radu. Li i dr. (2008) su testiraju i metanolne ekstrakte 45 lekovitih biljaka iz Kine dobili nešto niže FRAP vrednosti (1,23 - 453,53  $\mu\text{mol}$  Fe(II)/g) u pore enju našim. Ekstrakti dobijeni razli itim rastvara ima su imali razli ite FRAP vrednosti, što je u skladu sa Javdan i Estakhr (2011) koji su pokazali da je metanolni ekstrakt *S. hypoleuca* ispoljio najja e redukuju e dejstvo u FRAP testu, za kojim slede etil acetatni i petroletarski ekstrakt. Metanolni ekstrakti testiranih vrsta *Salvia* iz Irana pokazali su više vrednosti u FRAP testu u pore enju sa etil acetatnim ekstraktima, sem u slu aju *S. limbata* (Gohari i dr., 2011), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji za biljku *S. ringens*.



Antioksidativna aktivnost procenjena  $\beta$ -CB testom se uobičajeno izražava u procentima inhibicije dekolorizacije  $\beta$ -karotena u sistemu  $\beta$ -karoten/linolna kiselina ili pomoću  $IC_{50}$  vrednosti. Ekstrakti su ispoljili aktivnost u inhibiciji dekolorizacije  $\beta$ -karotena u  $\beta$ -CB testu (13,30 - 84,04%). Većina ekstrakata je pokazala veću i procenat inhibicije od askorbinske kiseline (17,82%), dok su etanolni i vodeni ekstrakti *S. ringens* ispoljili veću inhibiciju i od BHA (53,72%) i od BHT (57,71%). U odnosu na procenat inhibicije, za ekstraktima *S. ringens* sledili su ekstrakti *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii*.

Metanolni ekstrakti osam vrsta žalfija iz Turske su pokazali procenat inhibicije od 62,50 do 75,8% (Tosun i dr., 2009). Tepe i dr. (2006, 2007) i Tepe (2008) su se tako bavili antioksidativnom aktivnošću u nekoliko taksona roda *Salvia* iz Turske, čiji su metanolni ekstrakti inhibirali dekolorizaciju  $\beta$ -karotena u opsegu od 29,00 do 77,03%. Rezultati ove studije su u saglasnosti sa rezultatima navedenih istraživanja.

Tokom poslednjih decenija se intenzivno vrše istraživanja antioksidativnog potencijala lekovitih biljaka, čiji rezultati pokazuju da biljke koje se koriste u ishrani sadrže mnogobrojne polifenolne komponente koje ispoljavaju snažnije *in vitro* antioksidativno dejstvo od vitamina E i C (Rice-Evans i dr., 1997), pa su skorašnja istraživanja usmerena na ispitivanje antioksidativnih efekata ovih polifenola *in vivo*.

Ekstrakti biljaka analiziranih u ovoj studiji sadržali su fenolne kiseline (galnu, kafenu i ruzmarinsku) i flavonoide (aglikone i glikozide apigenina, luteolina, genkvanina i kvercetina, i kempferol glikozide kao dominantne komponente) (Tabele 9-11). Kako pokazuju rezultati prethodnih studija, neke od pomenutih fenolnih komponenti ispoljavaju snažno antioksidativno delovanje. Ekstrakti testiranih vrsta su bili bogati flavonolima, koji su odavno poznati kao važni hvatači i slobodnih radikala (Miliauskas i dr., 2004). Kafena kiselina, ruzmarinska kiselina i njeni oligomerni derivati su istaknuti kao odlični antioksidansi koji neutrališu DPPH radikal sa efikasnošću u od oko 90%, dok su glikozidi luteolina i apigenina pokazuju slabu do osrednju aktivnost (Lu i Foo, 2001). Ruzmarinska kiselina je bila efikasnija od ekstrakata žalfija i komercijalnih antioksidansa u DPPH testu ( $IC_{50}=2,90 \mu\text{g/mL}$ ) i  $\beta$ -CB testu (100% inhibicije) (Tepe, 2008). Galna kiselina i kvercetin su procenjeni kao bolji hvatači i  $ABTS^{\cdot+}$  i  $DPPH^{\cdot}$  radikala u poređenju sa askorbinskom

kiselinom, dok je rutin bio znatno slabiji (Kim i Lee, 2002). Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina u studiji Chrpova i dr. (2010) je izmerena kao galna> ruzmarinska> kafena, dok su flavonoidi bili rangirani kao kvercetin> rutin> luteolin> apigenin> kempferol (Rice-Evans i dr., 1997). Koriste i ABTS test, Re i dr. (1999) su pokazali da neka od jedinjenja identifikovanih u ekstraktima istraživanih vrsta pokazuju antioksidativnu aktivnost (u opadaju em nizu): kvercetin> luteolin> kempferol> kafena kiselina, pri emu prva dva pokazuju ja u, a druga dva slabiju aktivnost u odnosu na askorbinsku kiselinu. Genkvanin je ocenjen kao slab hvata DPPH· radikala ( $IC_{50}$  vrednost=70,05  $\mu\text{g/mL}$ ) (Ray i dr., 2014). Kempferol je pokazao visok procenat inhibicije u DPPH, FRAP i  $\beta$ -CB testu ( 90%), dok su njegovi glikozidi ispoljili 5-10 puta slabiju aktivnost (Sivasothy i dr., 2013). Sa druge strane, pojedini derivati kempferola su se pokazali izuzetno efikasnim hvata ima DPPH· radikala sa  $IC_{50}$  vrednostima od oko 10,00  $\mu\text{g/mL}$  (Tatsimo i dr., 2012).

Fenolne kiseline, a zatim i flavonoidni aglikoni su bolji hvata i slobodnih radikala u pore enju sa flavonoidnim glikozidima, što se može objasniti glikozilacijom, odnosno prisustvom še ernih komponenti koja po pravilu smanjuju dostupnost molekula flavonoida za interakciju sa slobodnim radikalima (Rice-Evans i dr., 1996; Lu i Foo, 2001; Kumar i Pandey, 2013; Sivasothy i dr., 2013). Doprinos hidroksilnih grupa u neutralisanju slobodnih radikala je mnogo manji ukoliko se one nalaze na floroglucinol A prstenu nego na odgovaraju em katehol B prstenu (Lu i Foo, 2001). Tako luteolin sa etiri OH-grupe od kojih su dve na B prstenu pokazuje znatno ja u antioksidativnu aktivnost u odnosu na apigenin koji na tom mestu ima samo jednu OH-grupu. Kvercetin sa pet slobodnih OH-grupa pokazuje dvostruko ja u antioksidativnu aktivnost od odgovaraju eg glikozida rutina sa etiri OH-grupe. Dakle, aktivnost flavonoida kao hvata a slobodnih radikala u prvom redu zavisi od broja i rasporeda slobodnih hidroksilnih grupa, posebno na katehol B prstenu, koji predstavljaju glavne donore elektrona ili vodoni nih jona na molekulu flavonoida (Kumar i Pandey, 2013).

Za razliku od druge dve analizirane vrste, ekstrakti *S. jurisicii* su pokazali veoma slabu antioksidativnu aktivnost koja može biti objašnjena njihovim kvalitativnim sastavom i sadržajem polifenola. U ekstraktima ove biljke je bila odsutna ruzmarinska kiselina koja je

ranije opisana kao jedan od glavnih nosilaca antioksidativne aktivnosti polarnih frakcija ekstrakata biljaka porodice Lamiaceae (Generalic i Mekini i dr., 2014). Flavonoidni aglikoni i glikozidi, od kojih su neki detektovani u ekstraktima ove biljke, imaju relativno nizak sadržaj i srazmerno mali doprinos ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta usnatica u odnosu na fenolne kiseline. To se može smatrati razlogom zbog koga ekstrakti u kojima je izmjerena veća količina ukupnih fenola pokazuju slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na neke druge, što su objasnili i Kontogianni et al. (2013) upoređujući i antioksidativne efekte ekstrakata žalfije i ruzmarina.

#### **4.6. Korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata proučavanih vrsta**

Literaturni podaci pokazuju da su fenolne komponente lekovitih biljaka odgovorne za njihovo antioksidativno delovanje. Različite fenolne kiseline, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja pokazuju snažno *in vitro* i *in vivo* antioksidativno dejstvo (Rice-Evans i dr., 1997; Lu i Foo, 2001, 2002; Generalic i Mekini i dr., 2014; Skotti i dr., 2014). Imajući to u vidu, izražena je korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja pojedinih fenolnih komponenti ili grupa komponenti, s ciljem procene doprinosa koji određeno jedinjenje ili grupa jedinjenja imaju na izmerenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata. Korelacija je izražena preko Pearsonovih koeficijenata korelacije ( $r$ ) i interpretirana prema Taylor (1990).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata *S. amplexicaulis* je naj snažnije korelisana sa sadržajem ukupnih flavonola (Tabela 15). Kempferol glikozidi najviše doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata nezavisno od primenjenog testa ( $0,81 > r > 0,97$ ). Među fenolnim kiselinama, ruzmarinska kiselina je bila jako korelisana sa FRAP testom, a kafeinska kiselina sa  $\beta$ -CB testom. Spektrofotometrijski određeni sadržaji ukupnih fenola i flavonoida su se pokazali slabije korelisanim sa antioksidativnom aktivnošću u odnosu na određene pomoćne u HPLC.

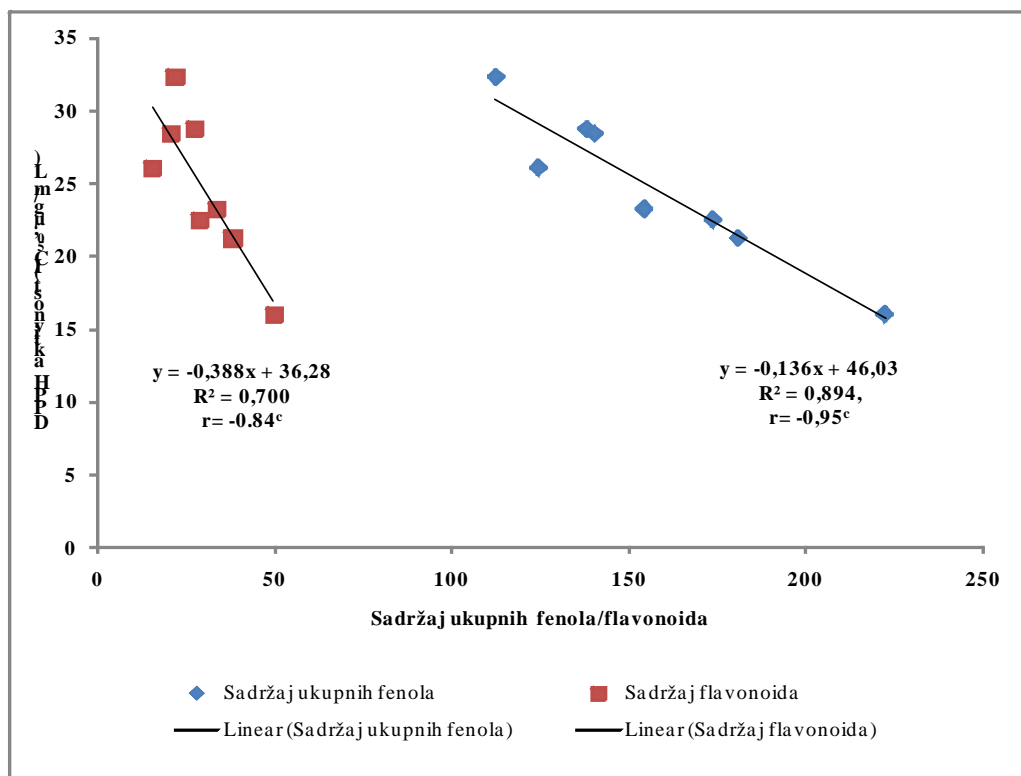
Antioksidativna aktivnost ekstrakata *S. amplexicaulis* je ja e korelisana sa sadržajem fenola (odre enim spektrofotometrijski i pomo u HPLC) nego sa sadržajem flavonoida. Neke od komponenti, kakvi su glikozidi kvercetina i kumarin su bili u jakoj negativnoj korelaciji sa antioksidativnom aktivnoš u. Korelacija izme u antioksidativnih testova se pokazala jakom, posebno izme u ABTS i FRAP testa ( $r=0,96$ ).

**Tabela 15.** Pirsonovi koeficijenti korelacije ( $r$ ) izme u sadržaja fenolnih komponenti i antioksidativne aktivnosti ekstrakata *S. amplexicaulis*.

	DPPH test	ABTS test	FRAP test	β-CB test
SADRŽAJ FENOLNIH KISELINA	-0,53 <sup>b</sup>	0,62 <sup>b</sup>	0,79 <sup>c</sup>	0,59 <sup>b</sup>
Kafena kiselina	-0,45 <sup>b</sup>	0,58 <sup>b</sup>	-0,81 <sup>c</sup>	0,73 <sup>c</sup>
Ruzmarinska kiselina	-0,54 <sup>b</sup>	0,61 <sup>b</sup>	0,79 <sup>c</sup>	0,51 <sup>b</sup>
SADRŽAJ FLAVONA	-0,52 <sup>b</sup>	0,52 <sup>b</sup>	0,54 <sup>b</sup>	0,10 <sup>a</sup>
Apigenin i glikozidi apigenina	-0,40 <sup>b</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,44 <sup>b</sup>	-0,13 <sup>a</sup>
Luteolin i glikozid luteolina	-0,60 <sup>b</sup>	0,62 <sup>b</sup>	0,59 <sup>b</sup>	0,24 <sup>a</sup>
Genkvanin i glikozidi genkvanina	-0,05 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>	-0,26 <sup>a</sup>
SADRŽAJ FLAVONOLA	-0,81 <sup>c</sup>	0,96 <sup>c</sup>	0,86 <sup>c</sup>	0,83 <sup>c</sup>
Glikozidi kempferola	-0,81 <sup>c</sup>	0,97 <sup>c</sup>	0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>c</sup>
Glikozidi kvercetina	0,56 <sup>b</sup>	-0,77 <sup>c</sup>	-0,72 <sup>c</sup>	-0,96 <sup>a</sup>
Kumarin	0,82 <sup>c</sup>	-0,99 <sup>c</sup>	-0,97 <sup>c</sup>	-0,84 <sup>c</sup>
Sadržaj ukupnih fenola (spektrofotometrijski)	-0,74 <sup>c</sup>	0,82 <sup>c</sup>	0,83 <sup>c</sup>	0,89 <sup>c</sup>
Sadržaj flavonoida (spektrofotometrijski)	0,24 <sup>a</sup>	-0,68 <sup>c</sup>	-0,71 <sup>c</sup>	-0,80 <sup>c</sup>
Sadržaj ukupnih fenola (HPLC)	-0,80 <sup>c</sup>	0,91 <sup>c</sup>	0,87 <sup>c</sup>	0,65 <sup>b</sup>
Sadržaj flavonoida (HPLC)	-0,78 <sup>c</sup>	0,88 <sup>c</sup>	0,82 <sup>c</sup>	0,62 <sup>b</sup>
DPPH test	1	-0,87 <sup>c</sup>	-0,81 <sup>c</sup>	-0,69 <sup>c</sup>
ABTS test		1	0,96 <sup>c</sup>	0,89 <sup>c</sup>
FRAP test			1	0,82 <sup>c</sup>
β-CB test				1

Prema Taylor (1990): <sup>(a)</sup>  $r < 0,35$  slaba korelacija; <sup>(b)</sup>  $0,36 < r < 0,67$  umerena korelacija; <sup>(c)</sup>  $0,68 < r < 1$  jaka korelacija

DPPH aktivnost metanolnih i etanolnih ekstrakata cele biljke i odvojenih delova *S. amplexicaulis* je nešto ja e korelisana sa sadržajem ukupnih fenola u ekstraktima ( $r=-0,95$ ), nego sa sadržajem flavonoida ( $r=-0,84$ ) (Slika 160).



**Slika 160.** Korelacija između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i DPPH aktivnosti ekstrakata cele biljke i odvojenih delova *S. amplexicaulis*; <sup>(c)</sup> 0,68 < r < 1 jaka korelacija (Taylor, 1990).

Pojedine fenolne komponente ili grupe fenolnih komponenti su različito korelisane sa antioksidativnom aktivnošću u ekstraktima *S. jurisicii* (Tabela 16). Nezavisno od korišćenog testa, antioksidativna aktivnost ekstrakata je bila snažno korelisana sa sadržajem flavonoida ( $r=0,84 - 0,96$ ), pri čemu je nešto jača korelacija na ena u slučaju flavona u odnosu na flavonole. Pojedinačno, kempferol glikozidi su pokazali najveći koeficijent korelacije sa svim antioksidativnim testovima ( $r$  vrednost između 0,83 i 0,89). Neke fenolne komponente, kao što su apigenin i kumarin, su pokazale negativnu korelaciju sa svim antioksidativnim testovima.

Prema prezentovanim vrednostima koeficijenta korelacije, aktivnosti uzoraka *S. jurisicii* u najvećoj meri bi mogli doprineti glikozidi kempferola i genkvanina (u DPPH testu), galna kiselina, glikozidi luteolina i kempferola (u ABTS testu), galna, kafena kiselina i glikozidi luteolina i kempferola (u FRAP testu) i galna kiselina i glikozidi

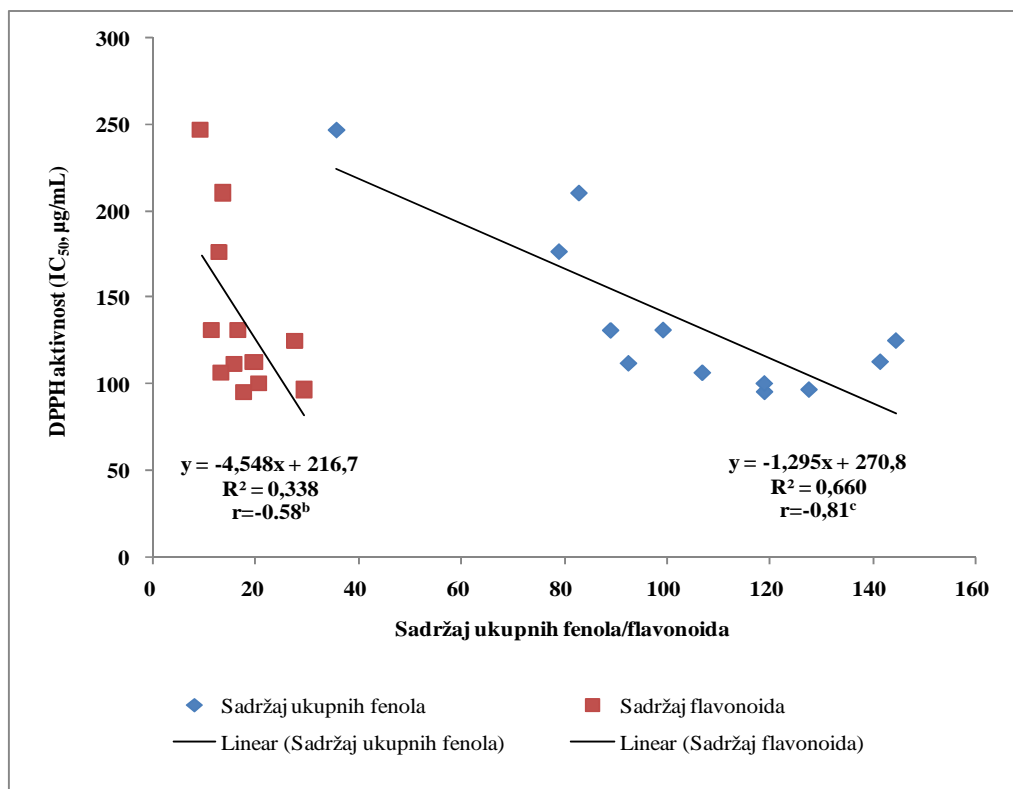
kempferola u  $\beta$ -CB testu. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida određen pomoću HPLC je bio snažnije korelisan sa antioksidativnim testovima u odnosu na onaj izmeren spektrofotometrijski. Testovi su se pokazali različito korelisanim međusobno, pri čemu je najjača korelacija nađena između DPPH i ABTS testa ( $r=0,92$ ), a najslabija između  $\beta$ -CB i ABTS testa ( $r=0,12$ ).

**Tabela 16.** Pirsonovi koeficijenti korelacije ( $r$ ) između sadržaja fenolnih komponenti i antioksidativne aktivnosti ekstrakata *S. jurisicii*.

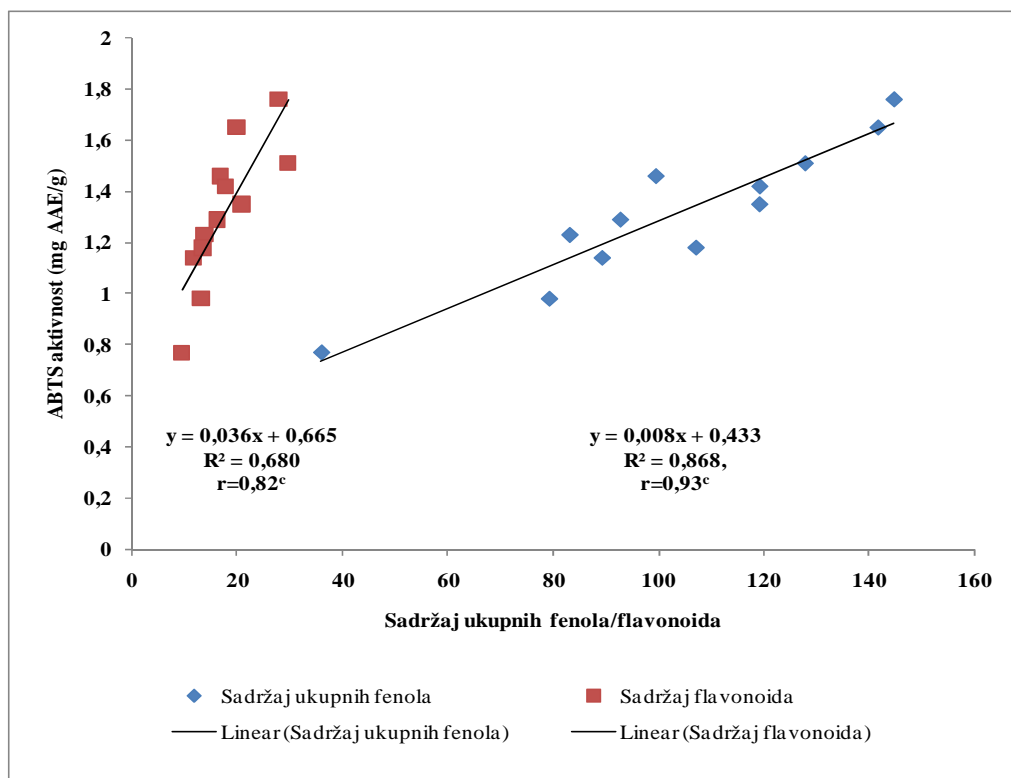
	DPPH test	ABTS test	FRAP test	$\beta$ -CB test
SADRŽAJ FENOLNIH KISELINA	-0,46 <sup>b</sup>	0,68 <sup>c</sup>	0,89 <sup>c</sup>	0,45 <sup>b</sup>
Galna kiselina	-0,58 <sup>b</sup>	0,81 <sup>c</sup>	0,80 <sup>c</sup>	0,69 <sup>c</sup>
Kafena kiselina	-0,35 <sup>a</sup>	0,54 <sup>b</sup>	0,84 <sup>c</sup>	0,28 <sup>a</sup>
SADRŽAJ FLAVONA	-0,90 <sup>c</sup>	0,91 <sup>c</sup>	0,83 <sup>c</sup>	0,71 <sup>c</sup>
Apigenin	0,12 <sup>a</sup>	-0,43 <sup>b</sup>	-0,60 <sup>b</sup>	-0,60 <sup>b</sup>
Glikozidi luteolina	-0,57 <sup>b</sup>	0,79 <sup>c</sup>	0,91 <sup>c</sup>	0,61 <sup>b</sup>
Glikozidi genkvanina	-0,82 <sup>c</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,54 <sup>b</sup>
SADRŽAJ FLAVONOLA	-0,76 <sup>c</sup>	0,85 <sup>c</sup>	0,82 <sup>c</sup>	0,89 <sup>c</sup>
Glikozidi kempferola	-0,83 <sup>c</sup>	0,89 <sup>c</sup>	0,86 <sup>c</sup>	0,85 <sup>c</sup>
Kvercetin i glikozidi kvercetina	-0,07 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	-0,55 <sup>b</sup>
Kumarin	0,12 <sup>a</sup>	-0,43 <sup>b</sup>	-0,60 <sup>b</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
Sadržaj ukupnih fenola (spektrofotometrijski)	-0,36 <sup>b</sup>	0,07 <sup>a</sup>	-0,44 <sup>b</sup>	0,22 <sup>a</sup>
Sadržaj flavonoida (spektrofotometrijski)	0,77 <sup>c</sup>	-0,93 <sup>c</sup>	-0,98 <sup>c</sup>	-0,80 <sup>c</sup>
Sadržaj ukupnih fenola (HPLC)	-0,92 <sup>c</sup>	0,95 <sup>c</sup>	0,87 <sup>c</sup>	0,81 <sup>c</sup>
Sadržaj flavonoida (HPLC)	-0,92 <sup>c</sup>	0,96 <sup>c</sup>	0,89 <sup>c</sup>	0,84 <sup>c</sup>
<b>DPPH test</b>	1			
<b>ABTS test</b>	-0,92 <sup>c</sup>	1		
<b>FRAP test</b>	-0,65 <sup>b</sup>	0,86 <sup>c</sup>	1	
<b><math>\beta</math>-CB test</b>	-0,84 <sup>c</sup>	0,12 <sup>a</sup>	-0,60 <sup>b</sup>	1

Prema Taylor (1990): <sup>(a)</sup>  $r < 0,35$  slaba korelacija; <sup>(b)</sup>  $0,36 < r < 0,67$  umerena korelacija; <sup>(c)</sup>  $0,68 < r < 1$  jaka korelacija

Antioksidativna aktivnost različitih etanolnih ekstrakata dobijenih iz celih biljaka i odvojenih delova *S. jurisicii* je na različite načine korelisana sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida (Slike 161 i 162). I DPPH i ABTS aktivnost su jače korelisane sa sadržajem ukupnih fenola u ekstraktima ( $r=0,81$ , odnosno  $0,93$ ), nego sa sadržajem flavonoida sa kojima su bili umereno do jako korelisani ( $r=0,58$ , odnosno  $0,82$ ). U oba slučaja su veće vrednosti koeficijenta korelacije dobijene za ABTS test (Slika 162).



**Slika 161.** Korelacija između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i DPPH aktivnosti ekstrakata cele biljke i odvojenih delova *S. jurisicii*; <sup>(b)</sup>  $0,36 < r < 0,67$  umerena korelacija, <sup>(c)</sup>  $0,68 < r < 1$  jaka korelacija (Taylor, 1990).



**Slika 162.** Korelacija između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i ABTS aktivnosti ekstrakata cele biljke i odvojenih delova *S. jurisicii*; <sup>(c)</sup>  $0,68 < r < 1$  jaka korelacija (Taylor, 1990).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata *S. ringens* je korelisana sa fenolnim komponentama/grupama komponenti na različite načine (Tabela 17). Na osnovu podataka dobijenih HPLC analizom izraunato je da je antioksidativna aktivnost ekstrakata ove biljke u većoj meri korelisana sa sadržajem flavonoida ( $r$  vrednosti od 0,24 do 0,80) nego fenolnih kiselina i ukupnog sadržaja fenola. Nasuprot tome, spektrofotometrijski izmeren sadržaj flavonoida je u manjoj korelaciji sa antioksidativnim delovanjem ekstrakata nego sadržaj ukupnih fenola ( $0,31 > r > 0,94$ ). Na osnovu prezentovanih koeficijenata se može videti da bi ukupni flavonoli, posebno kempferol glikozidi, mogli u najvećoj meri doprineti antioksidativnom potencijalu *S. ringens* ( $0,44 > r > 0,93$ ).

Različite komponente i grupe komponenti se istovremeno kao potencijalni nosioci antioksidativne aktivnosti ekstrakata *S. ringens* u različitim testovima: ukupni flavonoli i ukupni flavonoli, posebno glikozidi kempferola (u DPPH testu), glikozidi kempferola (u



ABTS testu), luteolin (u FRAP testu), kafena kiselina i glikozidi kempferola (u  $\beta$ -CB testu). Neke od komponenata, kao što su kumarin, apigenin i glikozidi apigenina, i kvercetin i glikozidi kvercetina su bili negativno korelisani sa ve inom antioksidativnih testova. Testovi su me usobno bili umereno do jako korelisani, pri emu su najve e vrednosti koeficijenta korelacije na ene izme u ABTS i FRAP testa ( $r=0,89$ ) i izme u DPPH i ABTS testa ( $r=0,79$ ). Što se ti e pojedina njih delova biljke *S. ringens*, ustanovljena je jaka korelacija antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, koja za DPPH test iznosi  $r=-0,95$  (za fenole) i  $r=-0,95$  (za flavonoide), a za ABTS test  $r=0,96$  za fenole i  $r=0,96$  za flavonoide (rezultati nisu grafi ki prikazani).

**Tabela 17.** Pirsonovi koeficijenti korelacije ( $r$ ) izme u sadržaja fenolnih komponenti i antioksidativne aktivnosti ekstrakata *S. ringens*.

	DPPH test	ABTS test	FRAP test	$\beta$ -CB test
SADRŽAJ FENOLNIH KISELINA	-0,44 <sup>b</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,53 <sup>b</sup>
Kafena kiselina i derivat kafene kiseline	-0,32 <sup>a</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,63 <sup>b</sup>
SADRŽAJ FLAVONA	-0,72 <sup>c</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,37 <sup>b</sup>	-0,16 <sup>a</sup>
Apigenin i glukozidi apigenina	-0,59 <sup>b</sup>	-0,02 <sup>a</sup>	-0,15 <sup>a</sup>	-0,12 <sup>a</sup>
Luteolin	-0,49 <sup>b</sup>	0,59 <sup>b</sup>	0,85 <sup>c</sup>	0,01 <sup>a</sup>
SADRŽAJ FLAVONOLA	-0,68 <sup>c</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,84 <sup>c</sup>
Glikozidi kempferola	-0,75 <sup>c</sup>	0,68 <sup>c</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,93 <sup>c</sup>
Kvercetin i glikozidi kvercetina	0,06 <sup>a</sup>	-0,62 <sup>b</sup>	-0,67 <sup>b</sup>	-0,10 <sup>a</sup>
Kumarin	-0,55 <sup>b</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	-0,04 <sup>a</sup>
Sadržaj ukupnih fenola (spektrofotometrijski)	-0,94 <sup>c</sup>	0,84 <sup>c</sup>	0,76 <sup>c</sup>	0,31 <sup>a</sup>
Sadržaj flavonoida (spektrofotometrijski)	-0,11 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,45 <sup>b</sup>	-0,57 <sup>b</sup>
Sadržaj ukupnih fenola (HPLC)	-0,74 <sup>c</sup>	0,45 <sup>b</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,77
Sadržaj flavonoida (HPLC)	-0,74 <sup>c</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,80 <sup>c</sup>
<b>DPPH test</b>	1			
<b>ABTS test</b>	-0,79 <sup>c</sup>	1		
<b>FRAP test</b>	-0,61 <sup>b</sup>	0,89 <sup>c</sup>	1	
<b><math>\beta</math>-CB test</b>	-0,50 <sup>b</sup>	0,62 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	1

<sup>a</sup> 0,35 slaba korelacija; <sup>b</sup> 0,36< $r$ <0,67 umerena korelacija; <sup>c</sup> 0,68< $r$ <1 jaka korelacija (Prema Taylor, 1990).

Polifenoli predstavljaju veoma bitnu grupu sekundarnih metabolita zato što deluju kao hvata i slobodnih radikala zahvaljuju i svojim hidrosilnim grupama (Tosun i dr., 2009). Rod *Salvia* sadži spektar od oko 160 polifenola, uključujući i različite fenolne kiseline i flavonoide zahvaljuju i kojima biljke ovog roda ispoljavaju antioksidativno dejstvo (Lu i Foo, 2001, 2002).

Nezavisno od analizirane vrste, antioksidativna aktivnost ekstrakata je bila jače korelisana sa sadržajem ukupnih fenola koji je određen spektrofotometrijski nego sa sadržajem flavonoida, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima roda *Salvia* (Lu i Foo, 2001; Pizzale i dr., 2002; Matkowski i dr., 2008b; Tosun i dr., 2009; Kamatou i dr., 2010; Stagos i dr., 2012; Ben Farhat i dr., 2013a, 2014), ali i drugih lekovitih biljaka različitih rodova i familija (Cai i dr., 2004; Tawaha i dr., 2007; Li i dr., 2008; Skotti i dr., 2014; Tusevski i dr., 2014). Nasuprot tome, Asadi i dr. (2010) i Stagos i dr. (2012) su izvestili o slabijoj korelaciji ABTS i DPPH aktivnosti sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida ekstrakata roda *Salvia*, dok se FRAP test pokazao jako korelisanim sa sadržajem ukupnih fenola (Asadi i dr., 2010). Sadržaj flavonoida određen pomoću HPLC je u nekim slučajevima bio viši i pokazao jaču korelaciju sa antioksidativnom aktivnošću od sadržaja ukupnih fenola, što je opisano i kod drugih lekovitih biljaka (Woydilo i dr., 2007; Lee i dr., 2011a).

Poredeći ova dva na ina kvantifikacije, može se primetiti da je antioksidativna aktivnost ekstrakata bila u slabijoj korelaciji sa spektrofotometrijski merenim sadržajem ukupnih fenola nego sa onim određenim pomoću HPLC, što je saglasno rezultatima prethodnih studija (Ben Farhat i dr., 2013a, 2014), sa izuzetkom ekstrakata *S. ringens*. U ovom slučaju se može pretpostaviti da jedna ili više fenolnih komponenti, koje nisu identifikovane HPLC analizom, značajno doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata *S. ringens*. Antioksidativna aktivnost ekstrakata žalfije i ruzmarina je pripisana prisustvu fenolnih abietanskih diterpena, kakvi su karnozolna kiselina i njeni derivati, izomeri karnozola i rozmanola (Kontogianni i dr., 2013), pri čemu ova jedinjenja nisu određena u našem radu.

Svi testovi su se pokazali ja e korelisanim sa sadržajem ukupnih fenola u pore enju sa sadržajem fenolnih kiselina, što je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Matkowski i dr. (2008b) testiraju i ekstrakte tri vrste *Salvia* DPPH testom. U ovom testu se koristi organski rastvara , zbog ega je mogu e testiranje antioksidativne aktivnosti kako hidrofilnih, tako i lipofilnih komponenti ekstrakta (Matkowski i dr., 2008b). Antioksidativna aktivnost ekstrakata je bila ja e korelisana sa sadržajem flavonoida nego sa sadržajem fenolnih kiselina, nasuprot rezultatima studija razli itih vrsta roda *Salvia* u kojima je antioksidativna aktivnost u ve oj meri pripisivana prisustvu razli itih fenolnih kiselina (naro ito ruzmarinske kiseline) nego prisustvu flavonoida (Lu i Foo 2001; Ben Farhat i dr., 2013a, 2014; Kontogianni i dr., 2013). Matkowki i dr. (2008b) su našli da ABTS aktivnost ekstrakata tri vrste žalfija više doprinose flavonoidi u listu i fenolne kiseline u korenu.

Ruzmarinska kiselina je bila umereno korelisana sa svim testovima, sem FRAP gde je korelacija ocenjena kao jaka, što je saglasno sa rezultatima Ben Farhat i dr. (2013a, 2014) i Generali -Mekini i dr. (2014). Za galnu kiselinu su izra unati visoki koeficijenti korelacije u svim testovima, a posebno u ABTS i FRAP, dok je kafena kiselina bila umereno do jako korelisana sa svim testovima, što je utvr eno i u prethodnim studijama žalfija (Ben Farhat i dr., 2009; 2013a, 2014)

Sadržaj flavonola je bio ja e korelisan sa antioksidativnom aktivnoš u *S. amplexicaulis* nego sadržaj flavona i ukupnih flavonoida. Do sli nog rezultata su došli Miliauskas i dr. (2004) testiraju i ekstrakte 12 lekovitih biljaka iz Litvanije. Me u flavonolima, rezultati svih testova su bili najviše korelisani sa sadržajem glikozida kempferola, emu u prilog idu rezultati studije Jung i dr. (2009) u kojoj su istaknuta jaka antioksidativna aktivnost pojedinih glikozida kempferola. Sadržaj flavona u ekstraktima *S. jurisicii* je, u pore enju sa sadržajem flavonola, bio nešto ja e korelisan sa antioksidativnom aktivnoš u ekstrakata u svim testovima. Glikozidi genkvanina su pokazali jaku korelaciju sa DPPH testom, a glikozidi luteolina sa ABTS i FRAP testom. Sadržaj luteolina je bio snažno korelisan sa FRAP aktivnoš u ekstrakata *S. ringens*, a ovi

rezultati su saglasni sa studijama pojedinih vrsta žalfija iz Tunisa (Ben Farhat i dr., 2013a,c).

Antioksidativni testovi su me usobno bili veoma razli ito i pozitivno korelisani, sa izuzetkom DPPH testa ija je korelacija sa ostalim merenim parametrima bila negativna (Grafik 160 i 161), što se objašnjava prezentovanjem rezultata ovog testa pomo u IC<sub>50</sub> vrednosti, gde se manjom vrednoš u ozna ava ja a aktivnost uzorka. Najviše vrednosti koeficienata korelacije su utvr ene za parove testova DPPH/ABTS i ABTS/FRAP. Sli no tome, rezultati DPPH testa za lekovite biljake iz Litvanije (Miliauskas i dr., 2004), iz Gr ke (Stagos i dr., 2012) i Makedonije (Tusevski i dr., 2014) su bili u snažnoj korelaciji sa onim dobijenim ABTS testom.

Woydilo i dr. (2007) i Li i dr. (2008) su utvrdili jaku korelaciju vrednosti dobijenih ABTS i FRAP testom za lekovite biljke iz Poljske, odnosno Kine. Vrednosti korelacija za DPPH/FRAP su bile srednje do visoke, što je u skladu sa rezultatima studije Dudonne i dr. (2009). Dakle, visoka korelisanost izme u ova tri testa se tuma i njihovim veoma sli nim mehanizmima reakcije koji su bazirani na transferu elektrona i redukciji slobodnih radikala (DPPH<sup>·</sup>, ABTS<sup>·+</sup>) i Fe<sup>3+</sup> jona (FRAP) (Floegel i dr., 2011; Wootton-Beard i dr., 2011). Suprotno tome, vrednosti u β-CB testu su bile slabije korelisane sa onima dobijenim primenom ostalih testova, što se prema Tiveron i dr. (2012) može pripisati razli itim principima reakcije u koje su uklju ene razli ite aktivne komponente uzorka.

Sadržaji kvercetina, apigenina, genkvanina i/ili njihovih glikozida, kao i kumarina u testiranim ekstraktima su u nekim slu ajevima bili negativno korelisani sa rezultatima jednog ili više antioksidativnih testova što je opisano u studijama drugih vrsta *Salvia* (Ben Farhat i dr., 2013a, 2014). Ovaj rezultat može biti objašnjen time što su ovi flavonoidi u najve em procentu bili prisutni u etil acetatnom i dihlometanskom ekstraktu koji su generalno ispoljili slabiju antioksidativnu aktivnost.

#### **4.7. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja i ekstrakata prou avanih vrsta**

Etanolni i vodeni ekstrakti nadzemnih delova biljaka sakupljenih u sezoni B su odabrani za dalje testiranje antimikrobne aktivnosti s obzirom da su pokazali značajnu antioksidativnu aktivnost u nizu prethodnih studija. Osim toga, ovi ekstrakti su netoksični i bezbedni za ljudsku upotrebu (Durling i dr., 2007; Stagos i dr., 2012). S obzirom da je *S. ringens* imala veći prinos etarskog ulja u odnosu na ostale dve vrste, testirana je antimikrobna aktivnost njenog etarskog ulja.

Etanolni i vodeni ekstrakti *S. amplexicaulis* su inhibirali rast testiranih bakterija, pri čemu su etanolni ekstrakti bili nešto jači inhibitori (MIC su bile u opsegu od 30,0 do 40,0 mg/mL) nego vodeni ekstrakti (MIC od 35,0 do <50,0 mg/mL). Ekstrakti su snažnije inhibirali rast Gram-pozitivnih bakterija u odnosu na Gram-negativne. Oba ekstrakata su ispoljila slabije dejstvo u poređenju sa komercijalnim antibiotikom streptomycinom čije su MIC bile 0,005 - 0,016 mg/mL. Najosetljivije bakterije su bile *Bacillus cereus* i *Micrococcus flavus*, a najrezistentnije *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 18). Vodeni ekstrakt *S. amplexicaulis* je delovao blago fungistatično na testirane vrste roda *Candida* (MIC su bile u opsegu od 16,0 do 64,0 mg/mL), ali ne i fungicidno, dok etanolni ekstrakt nije uticao na rast ovih vrsta. Među vrstama roda *Aspergillus*, jedino je rast *A. glaucus* inhibiran etanolnim i vodenim ekstraktom *S. amplexicaulis* (MIC je bila 16,0 mg/mL, odnosno 8,0 mg/mL). Etanolni i vodeni ekstrakti su pokazali značajno fungistatično i fungicidno dejstvo na *Trichophyton mentagrophytes* (MIC = 4,0 mg/mL; MFC = 16,0 mg/mL) (Tabela 19).

Etanolni i vodeni ekstrakt *S. jurisicii* su pokazali bakteriostatično dejstvo na sve testirane bakterije (MIC od 15,0 do >50,0 mg/mL), koje je bilo mnogostruko slabije u poređenju sa streptomycinom (MIC 0,005 - 0,016 mg/mL). Etanolni ekstrakt je bio efikasniji inhibitor rasta bakterija od vodenog (MIC bile u opsegu od 15,0 do 40,0 mg/mL odnosno od 30,0 do iznad 50,0 mg/mL). Generelno, Gram-pozitivne bakterije su bile senzitivnije na tretman ekstraktima *S. jurisicii*, među kojima su se najosetljivijim pokazale *S. aureus* i *M. flavus*, dok su *E. coli* i *Proteus mirabilis* bile najrezistentnije (Tabela 18). Etanolni ekstrakt *S. jurisicii* je delovao antifungalno samo na *C. albicans*, i to pri najvišoj

testiranoj koncentraciji (MIC/MFC = 64,0 mg/mL), dok vodeni ekstrakt nije bio aktivan. S druge strane, vodeni i etanolni ekstrakti su pokazali fungistati no (MIC je bila 32,0 odnosno 64,0 mg/mL) i fungicidno (MFC je bila 64,0 mg/mL) dejstvo na mikromicete roda *Aspergillus*, izuzev *A. fumigatus*. Etanolni ekstrakt (MIC 8,0 mg/mL) je pokazao izraženije fungistati no dejstvo na rast *T. mentagrophytes* u odnosu na vodeni ekstrakt (MIC 32,0 mg/mL) (Tabela 19). Etarsko ulje *S. ringens* je imalo najja e bakteristati no dejstvo (MIC bile u opsegu od 9,50 do 17,10 mg/mL), etanolni ekstrakt neznatno slabije (MIC 5,0 - 20,0 mg/mL), a vodeni najslabije (MIC 15,0 - 30,0 mg/mL). Gram-pozitivne bakterije su bile osetljivije na tretmane u odnosu na Gram-negativne. Najosetljivije su bile *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*, dok su *Pseudomonas tolasii* i *P. aeruginosa* bile najrezistentnije. U pore enju sa streptomycinom, etarsko ulje i ekstrakti *S. ringens* su pokazali slabiju antibakterijsku aktivnost (Tabela 18). Etarsko ulje *S. ringens* je ispoljilo snažno fungistati no i fungicidno dejstvo na sve testirane mikromicete, izuzev na *A. fumigatus* i *A. flavus* gde je izostao fungicidni efekat. Me utim, etanolni i vodeni ekstrakt ove biljke su pokazali mnogostruko slabiju aktivnost. Naime, antifungalni efekat ekstrakata je izostao u slu aju ve ine testiranih mikromiceta, sa izuzetkom etanolnog ekstrakta koji je inhibirao rast *C. krusei* i *C. albicans* pri najvišoj testiranoj koncentraciji (64,0 mg/mL) i vodenog ekstrakta koji je pri koncentraciji od 16,0 mg/mL delovao inhibitorno na rast *A. glaucus* (Tabela 19).

Generalno, etarsko ulje i ekstrakti svih testiranih biljaka su pokazali znatno slabije antibakterijsko i antifungalno dejstvo u pore enju sa komercijalnim antibiotikom i antimikotikom što je pokazano i za druge vrste žalfija (Tepe i dr., 2004, 2005; Kamatou i dr., 2007; Dulger i Hacioglu, 2008; Tepe, 2008; Cardile i dr., 2009; Askun i dr., 2009; Javdan i Estrakhr, 2011; Ibrahim, 2012; Firuzi i dr., 2013). Me utim, i me u vrstama je uo ena zna ajna razlika u antimikrobnom kapacitetu što se objašnjava razlikama u sastavu kao i sinergizmom komponenata ekstrakata (Akroum i dr., 2009; Metvally i dr., 2010; Sivasothy i dr., 2013; Tatsimo i dr., 2013). Sivasothy i dr. (2013) i Tatsimo i dr. (2013) su pokazali da su kempferol i njegovi glikozidi dobri i antibakterijski i antifungalni agensi, a Cowan (1999) i Sokovi i dr. (2013) da se efikasnost mnogih flavonoida može pove ati

razli itim tretmanima, na primer promenom stepena njihove hidroksilacije. Akroum i dr. (2009) su zabeležili znatno ve i antibakterijski efekat smeše apigenina, kvercetin 3-*O*-glukozida i kempferol 3-*O*-glukozida nego ovih flavonoida pojedina no i to objasnili njihovim sinergisti kim dejstvom.

Znatno ve a efikasnost etarskog ulja može se objasniti njegovom hemijskom prirodom. Naime, etarska ulja predstavljaju smešu lipofilnih komponenti niske molekulske mase koja lako prolazi kroz elijski zid i elijsku membranu ošte uju i njen lipoptoteinski sloj i pove avaju i permeabilnost (Cowan, 1999; Bakkali i dr., 2008; Tajkarimi i dr., 2010). Tepe i dr. (2004, 2005) su saopštili znatno ve u efikasnost etarskih ulja *S. cryptantha*, *S. multicaulis* i *S. tomentosa* u inhibiciji rasta testiranih bakterija i dve vrste roda *Candida* u pore enju sa razli itim ekstraktima ovih biljaka. Etarska ulja tri vrste žalfija poreklom iz Turske su inhibirala rast testiranih bakterija i mikromiceta pri koncentracijama od 4,5 do >72,0 mg/mL (Kelen i Tepe, 2008), dok su MIC etarskih ulja *S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *S. sclarea* i *S. triloba* za testirane bakterije bile niže od 10,0 mg/mL (Delamare i dr., 2007; Pierozan i dr., 2009). Sli ne MIC za testirane bakterije i mikromicete imali su i ekstrakti drugih vrsta žalfija (Tepe i dr., 2004, 2005; Kelen i Tepe, 2008; Kamatou i dr., 2007; Dulger i Hacıoglu, 2008; Askun i dr., 2009).

Literaturni podaci o antimikrobnoj aktivnosti testiranih vrsta dostupni su samo za etarska ulja *S. amplexicaulis* i *S. ringens*, dok je antimikrobna aktivnost *S. jurisicii* prvi put ispitana u ovoj studiji. Petrovi i dr. (2009) su analizirali hemijski sastav i antimikrobn u aktivnost etarskog ulja *S. amplexicaulis* i pokazali da ulje efikasnije inhibira rast Gram-pozitivnih bakterija i *C. albicans* (MIC 0,6 mg/mL) u odnosu na Gram-negativne bakterije. Sli no ovim rezultatima, etarsko ulje *S. ringens* var. *baldachiana* poreklom iz Makedonije efikasnije je inhibiralo rast Gram-pozitivnih bakterija (Šavikin i dr., 2008), a etarsko ulje uzorka uz Gr ke Gram-negativnih bakterija (Tzakou i dr., 2001). Ovi autori su antimikrobn u aktivnost etarskog ulja *S. ringens* uglavnom pripisali prisustvu 1,8-cineola, koji je bio dominantna komponenta i u našim uzorcima ove biljke. Me utim, Sonboli i dr. (2006) smatraju da je sinergizam pre svega izme u linalola, 1,8-cineola, -pinena, -pinena, -kariofilena i limonena odgovoran za antimikrobno dejstvo vrsta roda *Salvia*.

**Tabela 18.** Antibakterijska aktivnost testiranih ekstrakata i etarskog ulja proučavanih vrsta *Salvia* i komercijalnog antibiotika streptomicina prikazana kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC, mg/mL).

	Bakterije	Etanolni ekstrakti			Vodeni ekstrakti			Etarsko ulje	Streptomycin
		<i>S. amplexicaulis</i>	<i>S. jurisicii</i>	<i>S. ringens</i>	<i>S. amplexicaulis</i>	<i>S. jurisicii</i>	<i>S. ringens</i>	<i>S. ringens</i>	
Gram pozitivne	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	30	15	5	40	30	15	9,50	0,016
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 6051	30	20	10	35	40	20	9,50	0,005
	<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10786	30	15	10	35	30	20	9,50	0,010
	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 10054	40	25	15	>40	40	25	11,40	0,012
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	30	20	5	40	30	15	9,50	0,010
Gram negativne	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	40	30	15	>50	>50	25	14,25	0,012
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	40	25	10	50	40	20	14,25	0,010
	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	40	25	15	50	40	20	11,40	0,010
	<i>Pseudomonas tolasii</i> NCTC 387	35	25	20	50	40	30	14,25	0,016
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	40	30	20	>50	50	30	17,10	0,016
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14273	35	40	15	>40	>50	25	17,10	0,005



**Tabela 19.** Antifungalna aktivnost testiranih ekstrakata i etarskog ulja prou avanih vrsta *Salvia* i komercijalnog antimikotika ketokonazola prikazana kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC, mg/mL) i minimalna fungicidna koncentracija (MFC, mg/mL).

Mikromiceta	Kod	Etanolni ekstrakti						Vodeni ekstrakti						Etarsko ulje		Ketokonazol		
		<i>S. amplexicaulis</i>		<i>S. jurisicii</i>		<i>S. ringens</i>		<i>S. amplexicaulis</i>		<i>S. jurisicii</i>		<i>S. ringens</i>		<i>S. ringens</i>		MIC	MFC	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC			
<i>Candida krusei</i> (Castell.) Berkhout	BEOFB 821m	na	na	na	na	64	na	64	na	na	na	na	na	na	0,125	0,300	0,0078	0,0156
<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout	BEOFB 811m	na	na	64	64	64	na	32	na	na	na	na	na	na	0,125	0,300	0,0078	0,0156
<i>Candida parapsilosis</i> (Ashford) Langeron & Talice	BEOFB 831m	na	na	na	na	na	na	16	na	na	na	na	na	na	0,125	0,300	0,0078	0,0156
<i>Aspergillus glaucus</i> (L.) Link	BEOFB 301m	16	na	64	64	na	na	8	na	32	32	16	na	0,125	0,300	0,0078	0,0078	
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	BEOFB 232m	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	3,000	na	0,0078	0,0156	
<i>Aspergillus flavus</i> Link	BEOFB 221m	na	na	64	64	na	na	na	na	64	64	na	na	0,250	na	0,0078	0,0078	
<i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i> (C.P. Robin) Sabour.	BEOFB 1320m	4	4	8	32	na	na	16	16	32	32	na	na	0,750	1,500	0,0039	0,0078	

na – nema aktivnosti na testiranim koncentracijama

Veća osetljivost Gram-pozitivnih bakterija na dejstvo testiranih biljaka pokazana je i u drugim eksperimentima (Veli kovi i dr., 2003; Tepe i dr., 2004; Kamatou i dr., 2005; Cardile i dr., 2009; Petrovi i dr., 2009). Rezistentnost Gram-negativnih bakterija na lipofilne i amfifilne inhibitore objašnjena je postojanjem kompleksnijeg elijskog zida i spoljašnje membrane, barijera za penetraciju molekula antibiotika, kao i sintezom periplazmatičnih  $\beta$ -laktamaza (Livermore, 1995; Nikaido, 1996, 2003). Generalno, i u ovoj kao i u ranijim studijama pokazano je da su najsenzitivnije bakterije *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus* i *Bacillus cereus*, a najrezistentnije Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* i *Escherichia coli* (Veli kovi i dr., 2002, 2003; Tepe i dr., 2004, 2005; Kamatou i dr., 2005, 2007; Kelen i Tepe, 2008; Šavikin i dr., 2008; Cardile i dr., 2009; Kivrak i dr., 2009; Petrovi i dr., 2009; Javdan i Estakhr, 2011; Giweli i dr., 2013; Firuzi i dr., 2013; Mosafa i dr., 2014).

I ranija istraživanja su pokazala visoku osetljivost vrsta roda *Candida*, posebno *C. albicans*, na dejstvo etarskih ulja i ekstrakata žalfija (Tzakou i dr., 2001; Veli kovi i dr., 2002; Tepe i dr., 2004, 2005; Šavikin i dr., 2008). Dulger i Hacıoglu (2008) su pokazali da etanolni ekstrakt mešavine listova i rizoma endemične vrste *S. tigrina* ima snažniji fungistatični efekat nego ekstrakti odvojenih delova, naročito na rast vrsta roda *Candida* (MFC = 3,12 - 12,50 mg/mL). U slučaju vrsta roda *Aspergillus*, osetljivost na etarsko ulje i ekstrakte studiranih *Salvia* spp. je opadala od *A. glaucus* preko *A. flavus* do *A. fumigatus* koji je bio rezistentan i na vodene i na etanolne ekstrakte što je u saglasnosti sa ranijim rezultatima (Veli kovi i dr., 2002; Dulger i Hacıoglu, 2008; Karcioğlu i dr., 2011; Abu-Darwish i dr., 2013). Naše istraživanje je potvrdilo rezultate onih ranijih da je *Trichophyton mentagrophytes* jedna od najsenzitivnijih mikromicera na ekstrakte brojnih žalfija (Džami i dr., 2008; Soković i dr., 2009; Abu-Darwish i dr., 2013).

Antimikrobni potencijal ekstrakata žalfije zavisi i od polarnosti rastvarača. Naime, Tepe i dr. (2004, 2005) i Arslan i Celik (2008) su pokazali da ekstrakti dobijeni manje polarnim rastvaračima (heksanska, dihlorometanska) imaju naj snažnije antimikrobno dejstvo, nešto manje metanolni i etanolni ekstrakti, a da su vodeni ili veoma slabi ili potpuno neaktivni agensi. Međutim, u kasnijim istraživanjima Karcioğlu i dr. (2011) i

Ibrahim (2012) zabeležena je znatno veća efikasnost etanolnih i metanolnih ekstrakata nekoliko vrsta roda *Salvia* nego hloroformskih i petrol-etarskih ekstrakata. Etanolni ekstrakti *S. hypoleuca* su imali jaču u antibakterijsku aktivnost od vodenih (Javdan i Estrakhr, 2011), što se može pripisati različitijoj rastvorljivosti antimikrobnih komponenti (Ekpo i Etim, 2009).

Antimikrobno dejstvo mnogih polifenola, uključujući i različite fenolne kiseline, flavonoide i tanine (galna, kafena i ruzmarinska kiselina, apigenin, luteolin, genkvanin, kvercetin, hiperozid i drugi glikozidi kvercetina kao i kempferol glikozidi) je dobro poznato (Cowan, 1999; Akroum i dr., 2009; Lee i dr., 2010; Metvally i dr., 2010; Abedini i dr., 2013; Borges i dr., 2013; Tatsimo i dr., 2013).

#### 4.8. Citotoksičnost na aktivnost ekstrakata poznatih vrsta

Kancer nastaje usled defekta mehanizama koji determinišu ćelijsku deobu i ćelijsku smrt, usled čega dolazi do intenzivne proliferacije ćelija kombinovane sa inhibicijom apoptoze (Hanahan & Weinberg, 2000; Fantini i dr., 2015). Smatra se da kancerogeneza može biti indukovana oksidativnim stresom kuplovanim sa hroničnom inflamacijom tkiva (Reuter i dr., 2010; Sosa i dr., 2013).

Veliki broj novijih *in vitro* i *in vivo* studija ukazuje su pojedini biljni polifenoli veoma moćni antioksidansi i agensi sposobni da suprimiraju kancerogenezu (Wahle i dr., 2010; Fantini i dr., 2015), naročito ako se primenjuju kombinovano sa drugim polifenolima ili antikancerogenim lekovima (Fantini i dr., 2015). Na primer, kombinacija kvercetina i njegovog glikozida hiperozida pokazuje jače antikancerogene efekte nego ovi flavonoidi pojedinačno (Li i dr., 2014).

Većina hemotereputika koji se danas koriste u kliničkom lečenju kancera predstavljaju jedinjenja izolovana iz biljaka ili njihove sintetičke derivate (Batra i Sharma, 2013; Solowey i dr., 2014). Hipoteza od koje kreću mnogobrojna aktuelna istraživanja jeste da ekstrakti ili pojedine komponente izolovane iz lekovitih biljaka, poznatih po dugoj i uspešnoj tradicionalnoj upotrebi, pokazuju citotoksične efekte kao i komercijalni lekovi.

Citotoksi na aktivnost etanolnih i vodenih ekstrakata *S. ringens* je testirana na dve elijske linije humanog kolorektalnog karcinoma (HCT-116 i SW480) i na elijskoj liniji humane mijeloidne leukemije (K562), dok su etanolni i vodeni ekstrakti *S. amplexicaulis* i *S. ringens* testirani na HCT-116 i K562 elijskim linijama (Tabela 20).

U slučaju oba ekstrakta *S. amplexicaulis*, testiranih na HCT-116 elijskoj liniji, citotoksi na aktivnost ekstrakata je bila izraženija nakon 24 h tretmana u odnosu na 72 h. Vodeni ekstrakt *S. amplexicaulis* je pokazao jače citotoksično dejstvo na ovu elijsku liniju (114,11 µg/mL) u poređenju sa etanolnim ekstraktom. Vodeni ekstrakt je ispoljio citotoksično dejstvo na elijsku liniju K562 nakon 48 h tretmana sa IC<sub>50</sub> vrednošću od 151,07 µg/mL.

Etanolni ekstrakt *S. jurisicii* je pokazao citotoksično dejstvo na HCT-116 elijsku liniju, sa nešto nižom IC<sub>50</sub> vrednošću nakon 72 h tretmana (341,23 µg/mL). Vodeni ekstrakt nije pokazao citotoksično dejstvo na ovu elijsku liniju na testiranim koncentracijama. Vodeni ekstrakt je delovao na K562 elijsku liniju, ali pri najvišim korišćenim koncentracijama (IC<sub>50</sub>=456,21 µg/mL).

Etanolni i vodeni ekstrakti *S. ringens* su ispoljili višestruko jače citotoksično dejstvo na HCT-116 elijsku liniju nakon 24 h tretmana u odnosu na 72 h. Vodeni ekstrakt se pokazao nešto aktivnijim na ovu elijsku liniju (IC<sub>50</sub>=9,83 µg/mL) u odnosu na etanolni (IC<sub>50</sub>=31,83 µg/mL). Na elijsku liniju SW480 je delovao samo vodeni ekstrakt na visokim koncentracijama i to nakon 72 h tretmana (412,36 µg/mL). Vodeni ekstrakt je bio aktivan i protiv elijske linije K562 (173,06 µg/mL).

Kako pokazuju rezultati nekoliko studija, etarska ulja i ekstrakti vrsta roda *Salvia* pokazuju značajne citotoksične efekte na veliki broj elijskih linija humanih kancera (Kamatou i dr., 2005, 2008a,b; Fiore i dr., 2006, 2012; Loizzo i dr., 2007; Cardile i dr., 2009; Al-Kalaldehy i dr., 2010; Tundis i dr., 2011; Abu-Darwish i dr., 2012; Firuzi i dr., 2013; Fu i dr., 2013), ali ne utiču na vijabilnost intaktnih sisarskih makrofaga i keratinocita, što ih čini bezbednim za upotrebu u kozmetici i farmaceutskoj industriji (Abu-Darwish i dr., 2013).

**Tabela 20.** Citotoksi na aktivnost ekstrakata odabranih vrsta *Salvia* prezentovana kao IC<sub>50</sub> vrednost (µg/mL).

Vrsta	Ekstrakt/ standard	elijska linija				
		HCT-116		SW480		K562
		24 h	72 h	24 h	72 h	48 h
<i>S. amplexicaulis</i>	Etanolni	164,49 ± 3,65	581,87 ± 2,43	nt	nt	nt
	Vodeni	114,11 ± 4,12	160,82 ± 3,64	nt	nt	151,07 ± 26,24
<i>S. jurisicii</i>	Etanolni	393,33 ± 2,71	341,23 ± 2,85	nt	nt	nt
	Vodeni	>500	>500	nt	nt	456,21 ± 12,20
<i>S. ringens</i>	Etanolni	31,83 ± 1,89	179,30 ± 4,12	>500	>500	nt
	Vodeni	9,83 ± 0,28	406,71 ± 4,61	>500	412,36 ± 2,31	173,06 ± 5,16
	5-Fluorouracil*	0,018 ± 0,004	0,81 ± 0,49	nt	nt	nt

\*Prema Žiži i dr. (2013); nt - nije testirano.

Etanolni i vodeni ekstrakti vrsta roda *Salvia* analiziranih u ovoj studiji su ispoljili citotoksi no dejstvo na HCT-116, SW480 i K562 elijske linije humanog kancera sa približnim opsegom IC<sub>50</sub> vrednosti od oko 10,00 do >500,00 µg/mL. Sli an opseg IC<sub>50</sub> vrednosti utvr en je i u ranijim istraživanjima citotoksi ne aktivnosti ekstrakata vrsta roda *Salvia* iz Jordana (89,60 - >400,00 µg/mL) (Fiore i dr., 2006) i (5,83 - >200,00 µg/mL) (Abu-Dahab i dr., 2012), iz Južnoafri ke republike (21,67 - >100,00 µg/mL) (Kamatou i dr., 2005) i iz Irana (10,50- >100,00 µg/mL) (Firuzi i dr., 2013). Ekstrakti vrsta *Salvia* analiziranih u ovoj studiji su ispoljili višestruko slabiju citotoksi nost u odnosu na 5-fluorouracil koji je testiran na istoj elijskoj liniji i pod istim eksperimentalnim uslovima u jednoj od prethodnih studija (Žiži i dr., 2013). Ekstrakti drugih vrsta *Salvia* su tako e bili manje efikasni u odnosu na koriš ene komercijalne citostatike (Abu-Dahab i dr., 2012; Firuzi i dr., 2013).

U pore enju sa drugim vrstama, ekstrakti *S. ringens* su ispoljili najja e citotoksi no dejstvo nakon 24 h tretmana na HCT-116, koje se može smatrati zna ajnim (IC<sub>50</sub> < 30 µg/mL) na osnovu kriterijuma o citotoksi noj aktivnosti ekstrakata Ameri kog nacionalnog instituta za kancer (NCI) (Suffenes i Pezzuto, 1990). Literaturni podaci o citotoksi noj

aktivnosti analiziranih vrsta dostupni su samo za vrstu *S. ringens*, iji je metanolni ekstrakt ispoljio snažno citotoksi no delovanje na elije kancera kože (A431), dok su pojedini abietanski diterpeni izolovani iz korena ove biljke pokazali značajnu citotoksi nost na elije humanog cervikalnog adenokarcinoma (HeLa) (Janicsák i dr., 2007, 2011).

Na vijabilnost HCT-116 elija uticala su oba ekstrakta *S. amplexicaulis* ( $IC_{50}$  vrednosti  $>100 \mu\text{g/mL}$ ) i etanolni ekstrakt *S. jurisicii* ( $IC_{50}$  vrednosti  $>300 \mu\text{g/mL}$ ), dok je vodeni ekstrakt ove biljke bio bez citotoksi nog efekta na testiranim koncentracijama. Nasuprot tome, vodeni ekstrakti *S. amplexicaulis* i *S. ringens* su pokazali ja e citotoksi no dejstvo u pore enju sa etanolnim ekstraktima. Slike razlike su uočene i u studijama drugih lekovitih biljaka gde je citotoksi nost ekstrakata varirala u zavisnosti od rastvarača i dela biljke korišćenog za ekstrakciju (Karagöz i dr., 2007; Talib i Mahasneh, 2010; Tundis i dr., 2011; Fiore i dr., 2012; Firuzi i dr., 2013; Lee i dr., 2014).

Citotoksi nost ekstrakata testiranih u ovom radu je u najvećem broju slučajeva bila veća nakon 72 h tretmana u pore enju sa 24 h, što je u saglasnosti sa Fiore i dr. (2012) koji su pokazali da je citotoksi na aktivnost *S. menthifolia* zavisi kako od koncentracije ekstrakta, tako i od vremena reakcije.

Druga elijska linija humanog kolorektalnog karcinoma (SW480) je bila gotovo neosetljiva na tretmane ekstraktima *S. ringens*. Borralho i dr. (2009) su pokazali da je HCT-116 elijska linija značajno osetljivija na tretmane 5-fluorouracilom u odnosu na SW480.

Vodeni ekstrakti testiranih vrsta su pokazali citotoksi nost na K562 elije mijeloidne leukemije, sa  $IC_{50}$  vrednostima  $> 100 \mu\text{g/mL}$  rangiranim za ove vrste kao *S. amplexicaulis*  $< S. ringens$   $< S. jurisicii$ . Firuzi i dr. (2013) su pokazali nešto veći u citotoksi ni efekat različitih ekstrakata 11 iranskih vrsta žalfija na istoj elijskoj liniji ( $IC_{50}=15,60 - 111,30 \mu\text{g/mL}$ ).

Zapažene razlike u citotoksi nom dejstvu izmeđ u pojedinih biljnih vrsta i/ili različitih ekstrakata iste biljke mogu biti objašnjene razlikama u sastavu i/ili sadržaju aktivnih komponenti ekstrakata, među kojima su i različitih polifenola. Biljke koje se koriste u ishrani sadrže niz polifenola koji deluju individualno ili sinergistički kao inhibitori

proliferacije i induktori apoptoze elija kancera. Polifenoli u nekim slučajevima pokazuju slabu iskoristljivost *in vivo*, koja može biti prevaziđena kombinovanom upotrebom više polifenola (Fantini i dr., 2015). Štaviše, kombinacija kvercetina i njegovog glikozida hiperozida pokazuje jače antikancerogene efekte nego ovi flavonoidi pojedinačno (Li i dr., 2014). Mnogobrojna antikancerogena jedinjenja su identifikovana u ekstraktima vrsta roda *Salvia*, kakve su triterpenske kiseline (posebno ursolna kiselina), ruzmarinska kiselina, luteolin i kvercetin (Janicsák i dr., 2006; Xavier i dr., 2009a,b).

U ekstraktima *S. ringens* i *S. amplexicaulis* kao dominantne komponente su bili prisutni glikozidi kempferola (40 - 60%), a naročito kempferol 3-O-(6''-O-acetilglukozid)-7-O-ramnozid. Pojedini glikozidi kempferola su opisani kao snažni citotoksični agensi protiv nekoliko elijskih linija leukemije sa IC<sub>50</sub> vrednostima između 6,50 - 30,70 µg/mL (Dimas i dr., 2000), kao i protiv elijskih linija kancera pluća i kože (0,50 - 1,90 µg/mL) (Moon i dr., 2010). U poređenju sa etanolnim ekstraktima, vodeni ekstrakti *S. ringens* i *S. amplexicaulis* su pokazali snažnije citotoksično dejstvo, što se može pripisati prisustvu ili višem sadržaju nekih komponenti, od kojih su kafena kiselina (Prasad i dr., 2011), ruzmarinska kiselina (Xavier i dr., 2009a; Hossain i dr., 2014) i pojedini glikozidi apigenina (Srivastava i Gupta, 2007) ocenjeni kao obećavajući antikancerogeni agensi. U testiranim ekstraktima *S. jurisicii* navedena jedinjenja nisu bila prisutna, dok je sadržaj glikozida kempferola bio znatno niži (do 6,00%), čime se može objasniti slabo citotoksično dejstvo ove biljke u odnosu na ekstrakte ostalih vrsta. Etanolni ekstrakt ove biljke je sadržao pojedina fenolna jedinjenja, kao što su galna kiselina, glikozidi luteolina i hiperozid sa izrazitim citotoksičnim dejstvom (Yáñez i dr., 2004; Francisco i dr., 2014; Li i dr., 2014) koja su bila odsutna ili prisutna u manjim količinama u vodenom ekstraktu ove biljke.

#### 4.9. Antineurodegenerativna aktivnost ekstrakata prokulavanih vrsta

Oksidativni stres može igrati važnu ulogu u patogenezi neurodegenerativnih bolesti kao što su Alchajmerova bolest (AD) i Parkinsonova bolest (PD) (Di Mateo i dr., 2007; Orhan i dr., 2007).

Ajchajmerova bolest (AD) je progresivna degeneracija koja se prepoznaje se po gubitku kratkotrajne memorije i oštećenju ostalih kognitivnih funkcija (Perry i dr., 1996; Akhondzadeh i dr., 2003). Neurohemijski se prepoznaje po gubitku aktivnosti neurotransmitera acetilholina (ACh) i butirilholina (BuCh) u cerebralnom korteksu, koje hidrolizuju enzimi acetilcholinesteraza (AChE) i u manjoj meri butirilcholinesteraza (BuChE) (Orhan i dr., 2007, 2012). Stoga se u tretmanu AD koriste različiti sintetički i prirodni lekovi čiji se mehanizam delovanja zasniva na inhibiciji AChE (Perry i dr., 1996; Akhondzadeh i dr., 2003; Orhan i dr., 2007).

Parkinsonova bolest (PD) je progresivna neurodegeneracija koja se karakteriše nizom poremećaja motornih funkcija, a nastaje usled propadanja dopaminergičnih neurona srednjeg mozga (Gelb i dr., 1999; Nussbaum i Ellis, 2003; Hasegawa, 2010) uzrokovanog hiperprodukcijom kvinonskih derivata i posebne forme melanina (neuromelanina) koji nastaje iz dopamina u reakciji katalizovanoj tirozinazom (Khan i dr., 2007; Hasegawa, 2010). Tirozinaza (TYR) je uključena u procese enzimske oksidacije biljnih fenola i u biosintetski put melanina kod životinja (Masuda i dr., 2005; Kim i Uyama, 2005; Khan i dr., 2006; Wang i dr., 2006; Hasegawa, 2010; Loizzo i dr., 2012). Tirozinazni inhibitori se primenjuju u cilju poboljšanja kvaliteta hrane biljnog porekla i u lečenju hiperpigmentacije (Wang i dr., 2006; Khan i dr., 2007).

Žalfija, ruzmarin i mati njak su tradicionalno korišćene za "jačanje" mozga i pospešivanje memorije (Perry i dr., 1996). Etarska ulja i ekstrakti pojedinih vrsta roda *Salvia* deluju *in vitro* i *in vivo* kao moćni AChE inhibitori, posebno dalmatinska (*S. officinalis*), španska žalfija (*S. lavandulifolia*) i grčka žalfija (*S. triloba*) (Perry i dr., 1996, 2003; Akhondzadeh i dr., 2003; Savalev i dr., 2003; Kennedy i dr., 2006; Enol i dr., 2010; Barabandan i dr., 2012). Potencijal velikog broja vrsta žalfija u inhibiciji enzima uključeni u neurodegeneraciju je saopšten od strane istraživača iz Turske (Orhan i dr., 2007, 2012, 2013; Enol i dr., 2010). Znatno je manje literaturnih podataka o aktivnosti lekovitih biljaka kao inhibitora TYR (Lee i dr., 1997; Wang i dr., 2006; Lin i dr., 2011; Loizzo i dr., 2012), uključujući i podatke o vrstama roda *Salvia* (Lin i dr., 2011; Suntar i dr., 2011; Orhan i dr., 2012).



Etanolni i vodeni ekstrakti istraživanih vrsta *Salvia* i komercijalni lekovi galantamin i koji na kiselina su testirani na koncentracijama 25, 50 i 100 µg/mL na aktivnost u inhibiciji neurodegenerativnih enzima, acetilholinesteraze (AChE) i tirozinaze (TYR). Rezultati su predstavljani u procentima inhibicije enzima u Tabelama 21-22.

Oba ekstrakta *S. amplexicaulis* su inhibirali aktivnost AChE (25,05 - 27,98%) i TYR (62,40 - 68,44%). Ekstrakti su pokazali slabiju aktivnost u pore enju sa standardom galantaminom (42,38 - 57,11%), ali ja u u odnosu na koji nu kiselinu (35,73 - 51,81%). Ekstrakti *S. jurisicii* su inhibirali aktivnost AChE i TYR u opsegu 25,50 - 30,66%, odnosno 60,42 - 67,20%. Na testiranim koncentracijama, ekstrakti su pokazali niži procenat inhibicije AChE u pore enju sa standardom galantaminom i viši u odnosu na koji nu kiselinu. Etanolni i vodeni ekstrakti *S. ringens* su pokazali slabiju inhibiciju AChE (26,49 - 30,54%) u pore enju sa galantaminom. Potencijal ekstrakata da inhibiraju tirozinazu (52,24 - 64,92%) je bio viši u odnosu na koji nu kiselinu.

Ekstrakti *S. ringens* su se pokazali najefikasnijim u inhibiciji AChE, dok su ekstrakti *S. amplexicaulis* imali najve i potencijal u inhibiciji TYR. Ekstrakti 16 testiranih vrsta žalfija su inhibirale AChE i BChE na 100 µg/mL sa vrednostima izme u 5,32 - 44,12%. Me u njima, metanolni i etil acetatni ekstrakti *S. amplexicaulis* iz Turske su tako e bili efikasniji u inhibiciji TYR nego AChE (Orhan i dr., 2012), sa nižim vrednostima procenata inhibicije nego u ovom radu. Do sada nisu saopšeni rezultati istraživanja antineurodegenerativnog dejstva ekstrakata *S. jurisicii* i *S. ringens*.

Literaturni podaci o vrstama roda *Salvia* kao inhibitorima TYR su veoma oskudni. Suntar i dr. (2011) su prou avali inhibitorni efekat etanolnih ekstrakata dve vrste *Salvia* na TYR i našli da ekstrakt *S. crypantha* pokazuje ja u aktivnost u odnosu na *S. cyanescens*. Ekstrakti 16 vrsta žalfija testiranih u studiji Orhan i dr. (2012) su bili bez efekta ili su ispoljili veoma slabu inhibiciju TYR (<11,65%). Rezultati ovog rada su u skladu sa rezultatima koje su saopštili Masuda i dr. (2005), gde su etanolni ekstrakti 39 biljaka iz Japana inhibirali TYR u širokom opsegu vrednosti (6,80 - 60,80%). U jednoj od starijih studija Lee i dr. (1997) su prou avali inhibiciju melanogeneze pomo u 100 biljnih ekstrakata i utvrdili da ove biljke poseduju antitirozinaznu aktivnost izme u 3,00 - 85,00%.

**Tabela 21.** Potencijal etanolnih i vodenih ekstrakata prou avanih vrsta *Salvia* i komercijalnog inhibitora galantamina da inhibiraju aktivnost acetilholinesteraze prezentovana kao procenat inhibicije (%).

Uzorak/standard	Inhibicija acetilholinesteraze (%)						Galantamin
	<i>S. amplexicaulis</i>		<i>S. jurisicii</i>		<i>S. ringens</i>		
	Etanolni	Vodeni	Etanolni	Vodeni	Etanolni	Vodeni	
Konc. ekstrakta (µg/mL)							
25	25,65 ± 5,51	21,42 ± 4,58	30,66 ± 1,11	29,79 ± 2,46	30,54 ± 3,12	29,07 ± 2,52	42,38 ± 0,74
50	27,49 ± 3,40	25,86 ± 4,72	26,36 ± 2,09	29,48 ± 2,67	32,23 ± 1,99	29,04 ± 2,81	50,56 ± 0,51
100	27,98 ± 4,91	25,05 ± 4,08	25,50 ± 2,43	25,90 ± 2,64	27,80 ± 4,87	26,49 ± 4,56	51,81 ± 2,55

**Tabela 22.** Potencijal etanolnih i vodenih ekstrakata prou avanih vrsta *Salvia* i komercijalnog inhibitora koji ne kiseline da inhibiraju aktivnost tirozinaze prezentovana kao procenat inhibicije (%).

Uzorak/standard	Inhibicija tirozinaze (%)						Koji na kiseline
	<i>S. amplexicaulis</i>		<i>S. jurisicii</i>		<i>S. ringens</i>		
	Etanolni	Vodeni	Etanolni	Vodeni	Etanolni	Vodeni	
Konc. ekstrakta (µg/mL)							
25	65,12 ± 1,79	62,65 ± 1,04	65,07 ± 0,65	64,87 ± 0,99	61,80 ± 3,60	46,49 ± 0,15	35,73 ± 5,46
50	66,36 ± 0,60	62,40 ± 1,30	64,38 ± 0,90	61,61 ± 0,91	63,54 ± 2,53	52,24 ± 3,63	33,93 ± 3,78
100	68,44 ± 1,79	67,25 ± 0,87	67,20 ± 0,23	60,42 ± 0,82	63,93 ± 2,51	64,92 ± 0,83	51,81 ± 2,55

Procenat inhibicije AChE i TYR je u nekim slučajevima rastao sa povećanjem koncentracije ekstrakta, dok u drugim nije uočena ovakva pravilnost. Slični rezultati dobijeni su i u prethodnim istraživanjima gde su testirane rastuće koncentracije ekstrakata vrsta roda *Salvia* (Orhan i dr., 2007, 2013; Enol i dr., 2010).

Slični rezultati prethodnih studija (Božić i dr., 2011; Husni i dr., 2011), etanolni ekstrakti vrsta testiranih u ovom radu su bili jači inhibitori AChE i TYR u poređenju sa vodenim ekstraktima. Etanolni ekstrakti dobijeni sukcesivnom ekstrakcijom 14 vrsta žalfija iz Turske su pokazali nešto niže procenat inhibicije AChE (1,00 - 27,95%) (Orhan i dr., 2013) u odnosu na etanolne ekstrakte vrsta analiziranih u ovom radu, što se može pripisati razlikama u ekstrakcionoj proceduri.

Naime, Orhan i dr. (2007, 2013; Enol i dr., 2010) su našli da nepolarne frakcije velikog broja žalfija efikasnije inhibiraju AChE i BChE u odnosu na polarne. Orhan i dr. (2007) su pretpostavili da nepolarne frakcije poseduju viši sadržaj nepolarnih komponenti kao što su terpeni koji mogu biti aktivne komponente u testovima za evaluaciju antiholinesterazne aktivnosti. Perry i dr. (2003) su pretpostavili da dominantne monoterenske komponente etarskog ulja *S. lavandulifolia* (kamfor, 1,8-cineol, borneol - i β-pinen) mogu biti nosioci anti-AChE aktivnosti ulja ove biljke, koje se uglavnom može pripisati prisustvu 1,8-cineola (Savalev i dr., 2003).

Literaturni podaci ukazuju da ekstrakti lekovitih biljaka sadrže fenolne kiseline i flavonoide koji deluju kao inhibitori ovih enzima (Chang, 2009; Roseiro i dr., 2012; Xie i dr., 2014). Uočeno je da su ekstrakti sa značajnom inhibicijom TYR pokazali snažnu antioksidativnu aktivnost, ali još uvek nije utvrđeno da li važi obrnuto (Masuda i dr., 2005), što se može objasniti prisustvom fenolnih jedinjenja koji eliminišu slobodne radikale ili o-kvinone i na taj način inhibiraju TYR (Wang i dr., 2006).

Ekstrakti vrsta analiziranih u ovom radu su pokazali različite sposobnosti u inhibiciji AChE i TYR, koje mogu biti odraz kvalitativno-kvantitativnih razlika u njihovim fenolnim komponentama. Etanolni ekstrakti svih testiranih vrsta bili efikasniji inhibitori ovih enzima u odnosu na vodene ekstrakte, što može biti objašnjeno time da su pojedine fenolne komponente bile prisutne u većem sadržaju ili isključivo u etanolnim ekstraktima.

Takve komponente u etanolnim ekstraktima su 5-*O*-glukozidi luteolina i genkvanina, rutin i hiperozid (*S. amplexicaulis*), galna kiselina, glikozidi luteolina i hiperozid (*S. jurisicii*) i apigenin, luteolin, hiperozid i kumarin (*S. ringens*). Generalno, ekstrakti *S. amplexicaulis*, *S. jurisicii* i *S. ringens* sadrže različite fenolne komponente, od kojih su galna, kafena i ružmarinska kiselina, apigenin, luteolin, kvercetin, kempferol i njihovi glikozidi opisani kao inhibitori AChE i TYR (Kang i dr., 2004; Kim i Uyama, 2005; Chang, 2009; Roseiro i dr., 2012; Loizzo i dr., 2012; Xie i dr., 2014).

Flavonoidi sa  $\beta$ -keto grupom su opisani kao moćni TYR inhibitori, što se pripisuje strukturalnoj sličnosti sa L-DOPA zbog čega se kompetitivno vezuju za tirozinazu. Flavonoidi sa strukturom hidroksi-4-keto, kakvi su kempferol i kvercetin, ireverzibilno inhibiraju tirozinazu tako što grade helate sa jonom bakra iz aktivnog centra ovog enzima (Kim i Uyama, 2005). Flavonoidi sa hidroksilnom grupom na A prstenu i sa generalno većim stepenom hidroksilacije, pokazuju izraženiju sposobnost da vežu i inhibiraju AChE, po kojoj su flavonoidi rangirani kao kvercetin > luteolin > apigenin > kempferol (Xie i dr., 2014). Stoga, flavonoidni glikozidi su uglavnom slabiji inhibitori u odnosu na odgovarajuće aglikone, mada rezultati variraju u zavisnosti od broja, položaja i tipa šerernih komponenti (Kim i Uyama, 2005; Xie i dr., 2014). Iako šererne grupe ometaju vrsto vezivanje glikozida za aktivni centar tirozinaze, one istovremeno ometaju pristup L-DOPA i na taj način inhibiraju TYR aktivnost (Kim i Uyama, 2005).

Sem polifenola, biljke koje se koriste u ishrani sadrže i druge inhibitore AChE i TYR (terpene, sterole i alkaloidne) sa kojima polifenoli mogu delovati sinergistički u *in vivo* uslovima (Roseiro i dr., 2012).

## **5. ZAKLJUČCI**

Ovim istraživanjem se došlo do značajnih rezultata o mikromorfološkim, anatomskim i citološkim karakteristikama *Salvia amplexicaulis*, *S. jurisicii* i *S. ringens* sakupljenih u Republici Makedoniji. S obzirom da su uzorci ovih vrsta sa drugih lokaliteta parcijalno istraženi u okviru širih fitohemijskih studija, u ovom radu je izvršeno sveobuhvatno ispitivanje antioksidativne, antimikrobne, citotoksične i antineurodegenerativne aktivnosti uzoraka ovih vrsta iz Makedonije i sprovedena detaljna hemijska analiza u cilju nalaženja fitokonstituenata etarskih ulja i ekstraktata odgovornih za različita biološka dejstva.

1. Listovi analiziranih vrsta su bifacijalni, hipo- ili amfistomatini, sa paracitnim stomama, generalno sa veoma sličnim opštim planom građe. Provodni snopi i su u glavnom nervu karakteristično zaokruženi kolenhimom kao naličju i malobrojnim sklerenhimskim vlaknima kao licu lista. Stablo *S. jurisicii* i *S. amplexicaulis* je na poprečnom preseku četvorouglasto, dok je kod *S. ringens* okruglo. Neke od karakteristika stabala usnatica (subepidermalno distribuiran kolenhim, višeslojan na uglovima stabla, provodni elementi organizovani u prstenove sa grupicama sklerenhima iznad floema) su bili prisutni kod analiziranih vrsta.

2. Na vegetativnim i generativnim organima analiziranih vrsta su bile prisutne raznovrsne jednočelijske (kratke) do višočelijske (duge) neglandularne trihome. Među glandularnim su uočene peltatne, kapitatne i digitiformne trihome. Peltatne trihome su bile prisutne kod svih vrsta, ali je varirao broj čelijske sekretorne glavice od 8 (u jednom krugu) kod *S. jurisicii* do 12 (u dva kruga) kod *S. ringens*. Broj čelijske sekretorne glavice *S. amplexicaulis* nije utvrđen, jer su posmatrane u postsekretornoj fazi. Tip I („niske“ kapitatne trihome) sa više podtipova je uočeno kod svih analiziranih vrsta. Tip II („visoke“ kapitatne trihome) je bio prisutan sa pet morfoloških podtipova samo na delovima cveta *S. ringens*. Digitiformne trihome su se sastojale od 3 - 4 čelije približne širine u nizu, a uočene su na listovima *S. ringens* i *S. jurisicii*.

3. Orašice vrsta roda *Salvia* proučavane u ovom radu su se po dimenzijama rangirale kao *S. amplexicaulis* < *S. jurisicii* < *S. ringens*. Oblik orašica *S. jurisicii* i *S. ringens* je sferičan, a *S. amplexicaulis* prolatno-sferičan. Kod svih analiziranih vrsta ornamentacija površine je retikulatna. Merikarp sitnijih orašica *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* je oslušnjavao nakon 15 minuta i tek nakon 45 minuta kod krupnijih orašica *S. ringens*.

4. Rezultati palinološke analize pokazuju da *S. ringens* poseduje heksakolpatna, radijalno simetrična i izopolarna polenova zrna, prolatnog oblika i biretikulatne ornamentacije egzine. Floralne nektarije *S. ringens* su uoči ljuštenja u obliku prstena u bazi plodnika, pokrivene karakterističnim epidermisom sa modifikovanim stomama za izlučivanje nektara.

5. Rezultati sastava etarskog ulja dobijeni pomoću GC-FID i GC-MS pokazuju da su etarska ulja *S. amplexicaulis* i *S. jurisicii* uglavnom sastavljena od oksidovanih seskviterpena, dok su u ulju *S. ringens* dominirali oksidovani monoterpeni.

6. Vodeni i alkoholni ekstrakti svih vrsta su pokazali najviši prinos i spektrofotometrijski izmereni sadržaj ukupnih fenola, dok je najviši sadržaj flavonoida bio prisutan u etil acetatnim ekstraktima. Sadržaj ukupnih fenola je bio najviši u ekstraktima *S. ringens*, a flavonoida u ekstraktima *S. amplexicaulis*. Sadržaji ukupnih fenola i flavonoida su bili najviši u ekstraktima celih nadzemnih delova i listova. Poredeći i dve sezone, znatne varijacije su primećene u prinosu, ali ne i u sadržaju ukupnih fenola i flavonoida.

7. Rezultati HPLC-DAD analize su pokazali da je najveći broj fenolnih komponenti identifikovan u metanolnim ekstraktima, za kojima slede etanolni i vodeni ekstrakti. Kafena i ružmarinska kiselina su u najvećem procentu bile prisutne u ekstraktima *S. ringens*. Među flavonoidima su najzastupljeniji bili glikozidi kempferola, od kojih je kempferol 3-O-(6"-O-acetilglukozid)-7-O-ramnozid bio prisutan u pojedinim ekstraktima *S. amplexicaulis* i *S. ringens* sa približno 30-60%.

8. Pojedini vodeni i alkoholni ekstrakti *S. amplexicaulis* i *S. ringens* su redukovali DPPH radikal sa sličnom ili nešto višom efikasnošću u odnosu na standardni antioksidans BHT. Etarsko ulje *S. ringens* se pokazalo višestruko slabijim u odnosu na ekstrakte ove

biljke. Naj snažniju aktivnost u ABTS testu su ispoljili ekstrakti *S. ringens*, dok su u FRAP testu nešto aktivniji bili ekstrakti *S. amplexicaulis*. Etanolni i vodeni ekstrakti *S. ringens* su se pokazali efikasnijim od BHA i BHT u  $\beta$ -karoten/linolna kiselina testu. Pojedina no, ekstrakti listova i celih nadzemnih delova su ispoljili najviši antioksidativni kapacitet.

**9.** Antioksidativna aktivnost je ja e korelisana sa spektrofotometrijski izmerenim sadržajem ukupnih fenola, dok je korelacija sa rezultatima HPLC analize bila ja a u slu aju flavonoida, posebno glikozida kempferola. Najja i koeficijenti korelacije su utvr eni za parove testova DPPH/ABTS i ABTS/FRAP.

**10.** Ekstrakti, i posebno etarsko ulje *S. ringens* su pokazali antibakterijsko dejstvo na sve testirane vrste bakterija, me u kojima su najsenzitivnije bile *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus* i *Bacillus cereus*. Etarsko ulje *S. ringens* i ekstrakti *S. amplexicaulis* su delovali antifungalno na rast testiranih mikromiceta, posebno *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus glaucus* i pojedine vrste *Candida*. Etanolni ekstrakti svih vrsta su ispoljili ja e antibakterijsko, a vodeni nešto izrazitije antifungalno dejstvo.

**11.** Etanolni i posebno vodeni ekstrakt *Salvia ringens* delovao je citotoksi no na HCT-116 elijsku liniju kolorektalnog karcinoma, dok je vodeni ekstrakti *S. amplexicaulis* ispoljio naj snažniju citotoksi nost u slu aju K562 linije mijeloidne leukemije.

**12.** Ekstrakti testiranih vrsta su slabiji inhibitori AChE u odnosu na galantamin, ali ja i inhibitori TYR u odnosu na koji nu kiselinu. Etanolni ekstrakti svih testiranih biljaka su efikasnije inhibirali AChE i TYR u odnosu na vodene ekstrakte. Ekstrakti *S. ringens* su bili najefikasniji protiv AChE, dok je *S. amplexicaulis* naj snažnije inhibirala TYR.

**13.** Pojedini ekstrakti *S. ringens* i *S. amplexicaulis* predstavljaju obe avaju i izvor fenolnih jedinjenja koji mogu na i primenu kao antioksidansi, citotoksi ni agensi i inhibitori tirozinaze. U cilju potencijalne terapijske primene, neophodno je potvr ivanje dejstva kroz *in vivo* studije. Slede i korak u istraživanju bi uklju io izolovanje i identifikaciju pojedina nih komponenti i ispitivanje njihovog izolovanog efekta, ali i sinergisti kog efekta sa drugim komponentama i komercijalnim preparatima u *in vivo* uslovima.

## 6. LITERATURA

- Abdel-Moein, N. M., Abdel-Moniem, E. A., Mohamed, D. A., Hanfy, E. A. (2011). Evaluation of the anti-inflammatory and anti-arthritic effects of some plant extracts. *Grasas y Aceites*, 62(4): 365-374.
- Abedini, A., Roumy, V., Mahieux, S., Biabiany, M., Standaert-Vitse, A., Rivière, C., Sahpaz, S., Bailleul, F., Neut, C., Hennebelle, T. (2013). Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: 1-11.
- Abreu, M. E., Müller, M., Alegre, L., Munné-Bosch, S. (2008). Phenolic diterpene and  $\alpha$ -tocopherol contents in leaf extracts of 60 *Salvia* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(15): 2648-2653.
- Abu-Dahab, R., Afifi, F., Kasabri, V., Majdalawi, L., Naffa, R. (2012). Comparison of the antiproliferative activity of crude ethanol extracts of nine salvia species grown in Jordan against breast cancer cell line models. *Pharmacognosy magazine*, 8(32): 319-324.
- Abu-Darwish, M. S, Cabral, C., Ferreira, I. V., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Albdour, T. H., Salgueiro, L. (2013). Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed Research International* 2013: 1-9.
- Adaay, M. H., Al-Dujaily, S. S., Khazzal, F. K. (2013). Effect of aqueous extract of *Medicago sativa* and *Salvia officinalis* mixture on hormonal, ovarian and uterine parameters in mature female mice. *Journal of Materials and Environmental Science*, 4(4): 424-433
- Adams, R. P. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured publishing Co., Carol Stream, Illinois, USA.
- Adewusi, E. A., Moodley, N., Steenkamp, V. (2015). Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: a review. *African Journal of Biotechnology*, 9(49): 8257-8276.
- Agostini, F., Santos, A. C. A. D., Rossato, M., Pansera, M. R., Santos, P. L. D., Serafini, L. A., Molon, R., Moyna, P. (2009). Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(2): 473-478.



- Akçin, Ö. E., Özyurt, M. S., Şenel, G. (2011). Petiole anatomy of some Lamiaceae taxa. *Pakistan Journal of Botany*, 43(3): 1437-1443.
- Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. H., Khani, M. (2003). *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 28(1): 53-59.
- Akkol, E. K., Göger, F., Koşar, M., Başer, K. H. C. (2008). Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chemistry*, 108: 942-949.
- Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D., Lalaoui, K. (2009). Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4(2): 93-96.
- Aktaş, K., Özdemir, C., Akyol, M. Ö. Y., Baran, P. (2009). Morphological and anatomical characteristics of *Salvia tchihatcheffii* endemic to Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 8(18): 4519-4528.
- Al Sheef, B. N., Duletić-Laušević, S., Janošević, D., Budimir, S., Marin, M., Alimpić, A., Giweli A. A. M., Marin, P. D. (2013). Micromorphology and ultrastructure of trichomes of Libyan *Salvia fruticosa* Mill. *Archives of Biological Sciences*, 65(1): 239-246.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Albayrak, S., Sagdic, O. (2013). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian Journal of Science and Technology*, 37: 1-9.
- Al-Kalaldeh, J. Z., Abu-Dahab, R., Afifi, F. U. (2010). Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutrition Research*, 30(4): 271-278.
- Almeida, J. R. G. D. S., Souza, G. R., Silva, J. C., Saraiva, S. R. G. D. L., Júnior, R. G. D. O., Quintans, J. D. S. S., Barreto, R. D. S. S., Bonjardim, L. R., Cavalcanti, S. C. D. H., Junior, L. J. Q. (2013). Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. *The Scientific World Journal*, 2013: 1-5.

- Alvarenga, S. A. V., Gastmans, J. P., do Vale Rodrigues, G., Moreno, P. R. H., de Paulo Emerenciano, V. (2001). A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies - diterpenes in Lamiaceae. *Phytochemistry*, 56(6): 583-595.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17): 7915-7922.
- Aminudin, N. I., Farediah, A., Taher, M. (2015). *In vitro* antioxidant, cholinesterase and tyrosinase inhibitory activities of *Calophyllum symingtonianum* and *Calophyllum depressinervosum* (Guttiferae). *Journal of Coastal Life Medicine*, 3(2): 126-131.
- Ana kov, G., Božin, B., Zori , L., Vukov, D., Mimica-Duki , N., Merkulov, L, Igi , R., Jovanovi , M., Boža, P. (2009). Chemical Composition of Essential Oil and Leaf Anatomy of *Salvia bertolonii* Vis. and *Salvia pratensis* L. (Sect. Plethiosphace, Lamiaceae). *Molecules*, 14: 1-9.
- Antognoni, F., Iannello, C., Mandrone, M., Scognamiglio, M., Fiorentino, A., Giovannini, P. P., Poli, F. (2012). Elicited *Teucrium chamaedrys* cell cultures produce high amounts of teucrioside, but not the hepatotoxic neo-clerodane diterpenoids. *Phytochemistry*, 81: 50-59.
- Arslan, I., Celik, A. (2008). Chemical composition and antistaphylococcal activity of an endemic *Salvia chrysophylla* Stapf naturally distributed Denizli province (Turkey) and its vicinity. *Pakistan Journal of Botany*, 40: 1799-1804.
- Asadi, S., Ahmadiani, A., Esmaeili, M. A., Sonboli, A., Ansari, N., Khodaghali, F. (2010). *In vitro* antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. *Food and chemical toxicology*, 48(5): 1341-1349.
- Ascensão, L., Marques, N., Pais, M. S. (1995). Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany*, 75(6): 619-626.
- Ascensão, L., Mota, L., Castro, M. D. M. (1999). Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany*, 84(4): 437-447.
- Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Ates, M. (2009). Characterization of the phenolic composition and antimicrobial activities of Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 47(7): 563-571.

- Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Modanlioglu, S., Yalcin, O. (2012). Antimycobacterial activity some different Lamiaceae plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds, In: Cardona, P. J. (Ed.), Understanding tuberculosis - new approaches to fighting against drug resistance. InTech Europe, Rijeka, Croatia, pp. 309-336.
- Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P. (2012). *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus *in vitro*. Chemotherapy, 58(1): 70-77.
- Bahadori, M. B., Mirzaei, M. (2015). Cytotoxicity, antioxidant activity, total flavonoid and phenolic contents of *Salvia urmiensis* Bunge and *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. Research Journal of Pharmacognosy, 2(2): 27-32.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. Food and chemical toxicology, 46(2): 446-475.
- Balunas, M. J., Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. Life Science, 78(5): 431-441.
- Baran, P., Özdemir, C. (2006). The morphological and anatomical characters of *Salvia napifolia* Jacq. in Turkey. Bangladesh Journal of Botany, 35(1): 77-84.
- Baran, P., Özdemir, C., Aktas, K. (2008). The morphological and anatomical properties of *Salvia argentea* L.(Lamiaceae) in Turkey. Research journal of agriculture and biological sciences, 4(6): 725-733.
- Baran, P., Özdemir, C. (2009). The morphological and anatomical properties of *Lamium lycium* (Lamiaceae), endemic to Turkey. Nordic Journal of Botany, 27(5): 388-396.
- Baran, P., Özdemir, C., Aktas, K. (2010). Structural investigation of the glandular trichomes of *Salvia argentea*. Biologia, 65: 33-38.
- Baradaran, A., Rabiei, Z., Rafieian, M., Shirzad, H. (2012). A review study on medicinal plants affecting amnesia through cholinergic system. Journal of Herbmed Pharmacology, 1(1): 3-9.
- Bari evi , D., Bartol, T. (2000). The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus, In: Kintzios, S. E. (ed.), The Genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 143-184.

- Bari evi , D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Župan i , A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology*, 75(2): 125-132.
- Batra, P., Sharma, A. K. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3(6): 439-459.
- Ben Farhat, M., Jordán, M.J., Chaouech-Hamada, R., Landoulsi, A., Sotomayor, J.A. (2009). Variations in essential oil, phenolic compounds and antioxidant activity of tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 10349-10356.
- Ben Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J., Jordán, M. (2013a). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49: 904-914.
- Ben Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J. (2013b). Profiling of essential oils and polyphenolics of *Salvia argentea* and evaluation of its by-products antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 47: 106-112.
- Ben Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J. (2013c). Phytochemical composition and *in vitro* antioxidant activity of by-products of *Salvia verbenaca* L. growing wild in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49: 373-379.
- Ben Farhat, M., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J., Landoulsi, A., Jordán, M. (2014). Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *Industrial Crops and Products*, 54: 78-85.
- Ben Farhat, M., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., Landoulsi, A., Jordán, M. J. (2015). Antioxidant properties and evaluation of phytochemical composition of *Salvia verbenaca* L. extracts at different developmental stages. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(1): 15-20.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Birkett, M. A., Abassi, S. A., Kröber, T., Chamberlain, K., Hooper, A. M., Guerin, P. M., Pettersson, J., Pickett, J. A., Slade, R., Wadhams, L. J. (2008). Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum haggarr from the East African plant, *Commiphora holtziana*. *Phytochemistry*, 69: 1710-1715.

- Bisio, A., Corallo, A., Gastaldo, P., Romussi, G., Ciarallo, G., Fontana, N., De Tommasi, N., Profumo, P. (1999). Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandege ex Epling grown in Italy. *Annals of Botany*, 83: 441-452.
- Blackburn, C. D. W. (2006). Food spoilage microorganisms. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Bnouham, M., Ziyat, A., Mekhfi, H., Tahri, A., Legssyer, A. (2006). Medicinal plants with potential antidiabetic activity-a review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism*, 14(1): 1-25.
- Bo a, M., Hacibekiro lu, I., Kolak, U. (2011). Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. *Pharmaceutical biology*, 49(3): 290-295.
- Bolton, E., Wang, Y., Thiessen, P. A., Bryant, S. H. (2008). PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities, In: Dixon, D. A. (Ed.), *Annual Reports in Computational Chemistry*. American Chemical Society, Washington, pp. 217-241.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4): 256-265.
- Borrvalho, P. M., Kren, B. T., Castro, R. E., Moreira da Silva, I. B., Steer, C. J., Rodrigues, C. M. (2009). MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS journal*, 276(22): 6689-6700.
- Božin, B., Mimica-Duki, N., Simin, N., Ana kov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5): 1822-1828.
- Büyükkartal, H., Kahraman, A., Çölgeçen, H., Dogan, M., Karabacak, E. (2011). Mericarp micromorphology and anatomy of *Salvia hedgeana* Dönmez, *S. huberi* Hedge and *S. rosifolia* Sm. (section *Salvia* Hedge, Lamiaceae). *Acta Botanica Croatica*, 70(1): 65-80.

- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17): 2157-2184.
- Capitani, M. I., Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., Tomás, M. C. (2013). Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15): 3856-3862.
- Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N. A., Piozzi, F. (2009). Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(2): 265-272.
- Çelep, F., Kahraman, A., Atalay, Z., Dogan, M. (2011). Morphology, anatomy and trichome properties of *Lamium truncatum* Boiss (Lamiaceae) and their systematic implications. *Australian Journal of Crop Science*, 5: 147-153.
- Çelep, F., Kahraman, A., Atalay, Z., Do an, M. (2014). Morphology, anatomy, palynology, mericarp and trichome micromorphology of the rediscovered Turkish endemic *Salvia quezelii* (Lamiaceae) and their taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 300(9): 1945-1958.
- Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 10(6): 2440-2475.
- Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K., Chattipakorn, N. (2007). *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 110(1): 61-68.
- Chavan, M. J., Wakte, P. S., Shinde, D. B. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark, *Phytomedicine*, 17: 149-151.
- Cherneva, E., Pavlovi , V., Šmelcerovi , A., Yancheva, D. (2012). The effect of camphor and borneol on rat thymocyte viability and oxidative stress. *Molecules*, 17(9): 10258-10266.
- Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, W. M., Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4): 1427-1435.

- Chrpova, D., Kourimska, L., Gordon, M. H., Hermanova, V., Roubíková, I., Panek, J. (2010). Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(4): 317-325.
- Clapperton, B. K., Eason, C. T., Weston, R. J., Woolhouse, A. D., Morgan, D. R. (1994). Development and testing of attractants for feral cats, *Felis catus* L. *Wildlife Research*, 21(4): 389-399.
- Coisin, M., Necula, R., Grigoras, V., Gille, E., Rosenhech, E., Zamfirache, M. M. (2012). Phytochemical evaluation of some *Salvia* species from Romanian flora. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" din Iasi*, 58(1): 35-44.
- Corsi, G., Bottega, S. (1999). Glandular hairs of *Salvia officinalis*: new data on morphology, localization and histochemistry in relation to function. *Annals of Botany*, 84(5): 657-664.
- Couladis, M., Tzakou, O., Stojanovi, D., Mimica-Duki, N., Jani, R. (2001). The essential oil composition of *Salvia argentea* L.. *Flavour and Fragrance Journal*, 16: 227-229.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytotherapy research*, 17(2): 194-195.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4): 564-582.
- Cragg, G. M., Newman, D.J. (2002). Drugs from nature: past achievements, future prospects. *Advances in Phytomedicine*, 1: 23-37.
- Cui, G., Duan, L., Jin, B., Qian, J., Xue, Z., Shen, G., John, H. S., Song, J., Chen, S., Huang, L., Reuben, J. P. (2015). Functional divergence of diterpene syntheses in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Plant physiology*, 169(3): 1607-1618.
- Cuvelier, M. E., Berset, C., Richard, H. (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3): 665-669.
- Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Stanoeva, J. P., Karapandzova, M., Stefova, M., Dimitrovska, A., Kulevanova, S. (2013). Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *Journal of Chromatography A*, 1282: 38-45.

- Dafni H., Lensky Y., Fahn A. (1988). Flower and nectar characteristics of nine species of Labiatae and their influence on honeybee visits. *Journal of Apicultural Research*, 27: 103-114.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10): 7313-7352.
- Daouk, D., Dagher, S., Sattout, E. (1995). Antifungal activity of the essential oil *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, 58: 1147-1149.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 140-146.
- De Martino, L., Roscigno, G., Mancini, E., De Falco, E., De Feo, V. (2010). Chemical composition and antigerminative activity of the essential oils from five *Salvia* species. *Molecules*, 15(2): 735-746.
- Delamare, A. P. L., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food chemistry*, 100(2): 603-608.
- Demirezer, L.Ö., Perihan G., Kelicen U ur, E.P., Bodur. M., Özenver, N., Güvenalp, Z. (2014). Molecular docking and *ex vivo* and *in vitro* anticholinesterase activity studies of *Salvia* sp. and highlighted rosmarinic acid. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 44: 1-8.
- Dent, M., Dragovi -Uzelac, V., Peni , M., Brnci , M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology and biotechnology*, 51(1): 84-91.
- Derakhshani, Z., Hassani, A., Pirzad, A., Abdollahi, R., Dalkani, M. (2012). Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity in some medicinal herbs cultivated in Iran. *Botanica Serbica*, 36(2): 117-22.
- Dereboylu, A. E., Güvensen, A., Gücel, S. (2010). Anatomical and palynological characteristics of *Salvia willeana* (Holmboe) Hedge and *Salvia veneris* Hedge endemic to Cyprus. *African Journal of Biotechnology*, 9(14): 2076-2088.



- Di Matteo, V., Pierucci, M., Di Giovanni, G., Esposito, E. (2007). Prevention and therapy of neurodegenerative disorders: role of nutritional antioxidants. In: Ali Qureshi, G., Hassan Parvez, S. (Eds.), *Oxidative stress and neurodegenerative disorders*, pp. 621-661.
- Dikli, N. (1974). Rod *Salvia* L. U: Josifovi, M. (Ed.), *Flora SR Srbije*. SANU, Beograd, pp. 432-453.
- Dimas, K., Demetzos, C., Mitaku, S., Marselos, M., Tzavaras, T., Kokkinopoulos, D. (2000). Cytotoxic activity of kaempferol glycosides against human leukaemic cell lines *in vitro*. *Pharmacological research*, 41(1): 83-86.
- Dinçer, C., Topuz, A., Nadeem, H., Özdemir, K. S., Çam, I. B., Tontul, I., Göktürk, R. S., Tu rul Ay, S. (2012). A comparative study on phenolic composition, antioxidant activity and essential oil content of wild and cultivated sage (*Salvia fruticosa* Miller) as influenced by storage. *Industrial Crops and Products*, 39: 170-176.
- Dinçer, C., Tontul, I., Çam, I. B., Özdemir, K. S., Topuz, A., Nadeem, H., Tu rul Ay, S., Göktürk, R. S. (2013). Phenolic composition and antioxidant activity of *Salvia tomentosa* Miller: effects of cultivation, harvesting year, and storage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(5): 561-567.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food chemistry*, 83(2): 255-262.
- Drakuli, D., Krsti, A., Stevanovi, M. (2012). Establishment and initial characterization of SOX2-overexpressing NT2/D1 cell clones. *Genetics and molecular research*, 11: 1385-1400.
- Drew, B. T., Sytsma, K. J. (2012). Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *American Journal of Botany*, 99(5): 933-953.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5): 1768-1774.
- Duleti -Lauševi, S., Marin, P. D. (1999). Pericarp structure and myxocarpy in selected genera of Nepetoideae (Lamiaceae). *Nordic Journal of Botany*, 19(4): 435-446.

- Dulger, B., Hacıoglu, N. (2008). Antifungal activity of endemic *Salvia tigrina* in Turkey. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3): 1051-1054.
- Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., Perry, N. B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*, 101(4): 1417-1424.
- Dweck, A. C. (2000). The Folklore and Cosmetic Use of Various *Salvia* Species, In: Kintzios, S. E. (Ed.), *The Genus Salvia*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 1-25.
- Dyubeni, L., Buwa, L. V. (2012). Foliar micromorphology of *Salvia greggii* A. Gray (Lamiaceae). *African Journal of Plant Science*, 6: 32-38.
- Džami, A., Soković, M., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., Marin, P. D. (2008). Chemical composition and antifungal activity of *Salvia sclarea* (Lamiaceae) essential oil. *Archives of Biological Sciences*, 60(2): 233-237.
- Edewor-Kuponiya, T. I. (2013). Plant-derived compounds with potential sedative and anxiolytic activities. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 2: 63-78.
- Eidi, A., Eidi, M. (2009). Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 3(1): 40-44.
- Eidi, A., Eidi, M., Mozaffarian, V., Rustaiyan, A., Mazooji, A., Khaboori, Z., Nabiuni, F. (2011). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Salvia syriaca* L. in mice. *International Journal of Pharmacology*, 7(3): 394-399.
- Ekpo, M. A., Etim, P. C. (2009). Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Sida acuta* on microorganisms from skin infections. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(9): 621-624.
- El-Akhal, F., Lalami, A. E. O., Zoubi, Y. E., Greche, H., Guemmouh, R. (2014). Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(9): 746-750.

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Emanuel, V., Adrian, V., Sultana, N., Svetlana, C. (2011). Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extracts of *Cynara scolymus* (*Cynarae folium*, Asteraceae family). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(6): 777-783.
- Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*, 109: 69-75.
- Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108: 229-257.
- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G. V., Tresoldi, I., Modesti, A., Bei, R. (2015). *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on Cancer treatment. *International journal of molecular sciences*, 16(5): 9236-9282.
- Fatiha, B., Didier, H., Naima, G., Khodir, M., Martin, K., Léocadie, K., Caroline, S., Mohamed, C., Pierre, D. (2015). Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 74: 722-730.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., Araujo, M. E. M. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108(1): 31-37.
- Fiore, G., Nencini, C., Cavallo, F., Capasso, A., Bader A., Giorgi, G., Micheli, L. (2006). *In vitro* antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. *Phytotherapy Research*, 20: 701-703.
- Fiore, G., Massarelli, P., Sajeve, M., Franchi, G. G. (2012). Anti-tumor activity of the methanolic extracts of *Salvia menthifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2): 381-387.
- Firuzi, O., Miri, R., Asadollahi, M., Eslami, S., & Jassbi, A. R. (2013). Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities and phenolic contents of eleven salvia species from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4), 801-810.

- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7): 1043-1048.
- Francisco, V., Figueirinha, A., Costa, G., Liberal, J., Lopes, M. C., García-Rodríguez, C., Geraldes, C. F., Cruz, M. T., Batista, M. T. (2014). Chemical characterization and anti-inflammatory activity of luteolin glycosides isolated from lemongrass. *Journal of Functional Foods*, 10: 436-443.
- Fu, Z., Wang, H., Hu, X., Sun, Z., Han, C. (2013). The pharmacological properties of *Salvia* essential oils. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(7), 122-127.
- Garland, S. (2006). *The Complete Book of Herbs & Spices: An Illustrated Guide to Growing and Using Culinary, Aromatic, Cosmetic and Medicinal Plants*, Frances Lincoln.
- Gelb, D. J., Oliver, E., & Gilman, S. (1999). Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of neurology*, 56(1): 33-39.
- Generali -Mekini , I., Skroza, D., Ljubenkov, I., Šimat, V., Smole Možina, S., Katalini , V. (2014). *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: a correlation study. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1): 119-127.
- Georgiev, V., Marchev, A., Nikolova, M., Ivanov, I., Gochev, V., Stoyanova, A., Pavlov, A. (2013). Chemical compositions of essential oils from leaves and flowers of *Salvia ringens* Sibth. et Sm. growing wild in Bulgaria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(5): 624-629.
- Gill, S. S., Seitz, D. P. (2015). Lifestyles and cognitive health: what older individuals can do to optimize cognitive outcomes. *JAMA*, 314(8): 774-775.
- Giweli, A., Džami , A. M., Sokovi , M., Risti , M. S., & Marin, P. D. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya. *Molecules*, 17(5): 4836-4850.
- Giweli, A. A., Džami , A. M., Sokovi , M., Risti , M. S., Jana kovi , P., Marin, P. D. (2013). The chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Salvia fruticosa* growing wild in Libya. *Archives of Biological Sciences*, 65(1): 321-329.

- Gliši , S., Risti , M., Skala, D. (2011). The combined extraction of sage (*Salvia officinalis* L.): ultrasound followed by supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 318-326.
- Gohari, A. R., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Ajani, Y., Hadjiakhoondi, A. (2011). Antioxidant activity of some medicinal species using FRAP assay. *Journal of Medicinal Plants*, 1(37): 54-60.
- González, A. G., Abad, T., Jiménez, I. A., Ravelo, A. G., Aguiar, J. G. L. Z., San Andrés, L., Plasencia, M., Herrera, J. R., Moujir, L. (1989). A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* species (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and ecology*, 17(4): 293-296.
- Gülçin, I., U uz, M. T., Oktay, M., Beydemir, ., Küfrevio lu, Ö. . (2004). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28(1): 25-33.
- Güllüce, M., Özer, H., Bari , Ö., Daferera, D., ahin, F., Polissiou, M. (2007). Chemical composition of the essential oil of *Salvia aethiopsis* L. *Turkish journal of biology*, 30(4): 231-233.
- Habibvash, F. N., Rajamand, M. A., Sarghein, S. H., Heidari, R., Ricani, M. H. (2007). Anatomical observations on nutlets of some *Salvia* species (Lamiaceae) from West Azarbaijan in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(19): 3385-3389.
- Halliwell, B. (2001a). Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences*, National University of Singapore, Singapore.
- Halliwell, B. (2001b). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs & aging*, 18(9): 685-716.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.
- Hanel, H., Raether, W. (1988). A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water insoluble preparations with a cell harvester, using miconazoleans an example. *Mycoses*, 31: 148-154.
- Harborne, J. B., Tomás-Barberán, F. A., Williams, C. A., Gil, M. I. (1986). A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry*, 25(12): 2811-2816.

- Harley, R. M., Atkins, S., Budantsev, A. L., Cantino, P. D., Conn, B. J., Grayer, R., Harley, M. M., de Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A. J., Ryding, O., Upsoni, T. (2004). Labiatae. In: Kadereit, J. W. (Ed.), Flowering plants: dicotyledons (Lamiales except Acanthaceae including Avicenniaceae), in: Kubitzki, K. (Ed.), The families and genera of vascular plants. Springer Verlag Berlin and Heidelberg, pp. 167–275.
- Hasegawa, T. (2010). Tyrosinase-expressing neuronal cell line as *in vitro* model of Parkinson's disease. International journal of molecular sciences, 11(3): 1082-1089.
- Hedge, I. C. (1970). Observations on the mucilage of *Salvia* fruits. Notes from the Royal Botanical Garden Edinburgh, 30: 79-95.
- Hedge, I. C. (1972). *Salvia* L. In: Tutin T. G, Heywood, V.H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters S. M., Webb, D.A. (Eds.). Flora Europaea. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 188-192.
- Hochmuth, D.H. (2006). MassFinder 3: Software for GC/MS interpretation and presentation, mass spectral library administration, Hamburg, Germany.
- Hossan, M. S., Rahman, S., Bashar, A. A., Jahan, R., Al-Nahain, A., Rahmatullah, M. (2014). Rosmarinic acid: a review of its anticancer action. World Journal of Pharmaceutical Sciences, 3: 57-70.
- Hostettmann, K., Borloz, A., Urbain, A., Marston, A. (2006). Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. Current Organic Chemistry, 10(8): 825-847.
- Husni, A., Jeon, J. S., Um, B. H., Han, N. S., Chung, D. (2011). Tyrosinase inhibition by water and ethanol extracts of a far eastern sea cucumber, *Stichopus japonicus*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91(9): 1541-1547.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Iqbal, T., Bhatti, I. A. (2011). Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. Pakistan Journal of Botany, 43(2): 1315-1321.
- Ibrahim, T. A. (2012). Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt. Molecules, 17(10): 11315-11334.
- Ifrim, C. (2012). Morphological peculiarities of the nutlets of some *Salvia* species (Lamiaceae). Contributii Botanice, 2012: 73-80.

- Ifrim, C., Toma, I. (2004). Histo-anatomical less known aspects upon some Lamiaceae taxa. *Analele stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza" din Iasi*, 50: 13-15.
- Imanshahidi, M., Hosseinzadeh, H. (2006). The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytotherapy Research*, 20(6): 427-437.
- Jafari, E., Andalib, S., Abed, A., Rafieian-Kopaei, M., Vaseghi, G. (2015). Neuroprotective, antimicrobial, antioxidant, chemotherapeutic, and antidiabetic properties of *Salvia reuterana*: a mini review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(1): 10-16.
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. N., Scheffler, A. (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants-rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 14(6): 2016-2031.
- Jamzad, Z., Grayer, R. J., Kite, G. C., Simmonds, M. S., Ingrouille, M., Jalili, A. (2003). Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(6): 587-600.
- Janick, J. (2003). Herbs: the connection between horticulture and medicine. *HortTechnology*, 13(2): 229-238.
- Janicsák, G., Veres, K., Kakasy, A. Z., Máthé, I. (2006). Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochemical systematics and ecology*, 34(5): 392-396.
- Janicsák, G., Hohmann, J., Nikolova, M., Genova, E., Zupkó, I., Forgo, P., Máthé, I. (2007). Compounds from *Salvia ringens* Sibth. & Sm. with cytotoxic activity. *Planta Medica*, 73(09): p. 371.
- Janicsák, G., Zupkó, I., Máthé, I., Hohmann, J. (2010). Comparative study of the antioxidant activities of eleven *Salvia* species. *Natural Product Communications*, 5: 227-230.
- Janicsák, G., Zupkó, I., Nikolova, M.T., Forgo, P., Vasas, A., Mathé, I., Blunden, G., Hohmann, J. (2011). Bioactivity-guided study of antiproliferative activities of *Salvia* extracts. *Natural Product Communications*, 6: 575-579.
- Janošević, D., Budimir, S., Alimpić, A., Marin, P. D., Al Sheef, N., Giweli, A., Duletić-Laušević, S. (2016). Micromorphology and histochemistry of leaf trichomes of *Salvia aegyptiaca* (Lamiaceae). *Archives of Biological Sciences*. 68(2): 291-301.

- Jari , S., Mitrovi , M., ur evi , L., Kosti , O., Gaji , G., Pavlovi , D., Pavlovi , P. (2011). Phytotherapy in medieval Serbian medicine according to the pharmacological manuscripts of the Chilandar Medical Codex (15–16th centuries). *Journal of ethnopharmacology*, 137(1): 601-619.
- Javdan, N., Estakhr, J. (2011). *In vitro* antioxidant studies of various extracts of *Salvia hypoleuca*. *Research Journal of Pharmacology*, 5 (6): 86-89.
- Jennifer, C., Stephanie, C. M., Abhishri, S. B., Shalini, B. U. (2012). A review on skin whitening property of plant extracts. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(4): 332-347.
- Jun, N. J., Mosaddik, A., Moon, J. Y., Jang, K.-C., Lee, D.-S., Ahn, K. S., Cho, S. K. (2011). Cytotoxic activity of -caryophyllene oxide isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf, *Records of Natural Products*, 5: 242-246.
- Jung, H. J., Song, Y. S., Lim, C. J., Park, E. H. (2009). Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. *Journal of ethnopharmacology*, 126(2): 355-360.
- Kahl, R., Kappus, H. (1993). Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und-forschung*, 196(4): 329-338.
- Kahraman, A., Çelep, F., Dogan, M. (2009). Comparative morphology, anatomy and palynology of two *Salvia* L. species (Lamiaceae) and their taxonomic implications. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 16(1): 73-82.
- Kahraman, A., Çelep, F., Do an, M. (2010a). Morphology, anatomy, palynology and nutlet micromorphology of *Salvia macrochlamys* (Labiatae) in Turkey. *Biologia*, 65(2): 219-227.
- Kahraman, A., Çelep, F., Dogan, M. (2010b). Anatomy, trichome morphology and palynology of *Salvia chrysophylla* Stapf (Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 76(2): 187-195.
- Kahraman, A., Çelep, F., Do an, M., Guerin, G. R., Bagherpour, S. (2011). Mericarp morphology and its systematic implications for the genus *Salvia* L. section *Hymenosphace* Benth.(Lamiaceae) in Turkey. *Plant systematics and evolution*, 292(1-2): 33-39.



- Kahraman, A., Dogan, M. (2010). Comparative study of *Salvia limbata* CA and *S. palaestina* Bentham (sect. *Aethiopsis* Bentham, Labiatae) from East Anatolia, Turkey. *Acta Botanica Croatica*, 69(1): 47-64.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Gono-Bwalya, A. B., Van Zyl, R. L., Van Vuuren, S. F., Lourens, A. C. U., Baer, K. H. C., Demirci, B., Lindsey, K. L., Van Staden, J., Steenkamp, P. (2005). The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3): 382-390.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Figueiredo, A. C., Tilney, P. M., Van Zyl, R. L., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Van Vuuren, S. F. (2007). Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. *South African Journal of Botany*, 73(1): 102-108.
- Kamatou, G. P. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P. N., Viljoen, A. M. (2008a). South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. *Journal of ethnopharmacology*, 119(3): 664-672.
- Kamatou, G. P. P., Van Zyl, R. L., Davids, H., Van Heerden, F. R., Lourens, A. C. U., Viljoen, A. M. (2008b). Antimalarial and anticancer activities of selected South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. radula*. *South African Journal of Botany*, 74(2): 238-243.
- Kamatou, G. P., Viljoen, A. M., & Steenkamp, P. (2010). Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, 119(2): 684-688.
- Kamboj, V. P. (2000). Herbal medicine. *Current Science*, 78: 35-39.
- Kandemir, N. (2003). The morphological, anatomical and karyological properties of endemic *Salvia hypargeia* Fich. & Mey. (Lamiaceae) in Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 35(2): 219-236.
- Kang, H. S., Byun, D. S., Choi, J. S. (2004). Rosmarinic acid as a tyrosinase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*. *Natural Product Sciences*, 10(2): 80-84.
- Karagöz, A., Turgut-Kara, N., Çakır, Ö., Demirgan, R., Ari, . (2007). Cytotoxic activity of crude extracts from *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21(2): 220-222.

- Karaka , F. P., Yildirim, A., Türker, A. (2012). Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish Journal of Biology*, 36(6): 641-652.
- Karamian, R., Asadbegy, M., Pakzad, R. (2013). Essential oil compositions and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of the methanol extracts of two *Salvia* species (Lamiaceae) from Iran. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(11): 1171-1182.
- Karcioglu, L. U., Tanis, H. U., Comlekcioglu, N. A, Diraz, E., Kirecci, E., Aygan, A. (2011). Antimicrobial activity of *Salvia trichoclada* in southern Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13: 134-136.
- Karina, B. O., Érika, P., Almeriane, M. W., Brás, H. O. (2013). Influence of rosmarinic acid and *Salvia officinalis* extracts on melanogenesis of B16F10 cells. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(2): 249-258.
- Karousou, R., Vokou, D., Kokkini, S. (1998). Distribution and essential oils of *Salvia pomifera* subsp. *pomifera* (Labiatae) on the island of Crete (S Greece). *Biochemical systematics and ecology*, 26(8): 889-897.
- Kaya, A., Demirci, B., Baser, K. H. C. (2007). Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. *South African Journal of Botany*, 73(1): 29-34.
- Kelen, M., Tepe, B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource technology*, 99(10): 4096-4104.
- Kennedy, D. O., Pace, S., Haskell, C., Okello, E. J., Milne, A., Scholey, A. B. (2006). Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacology*, 31(4): 845-852.
- Khan, M. T. H., Choudhary, M. I., Mamedova, R. P., Agzamova, M. A., Sultankhodzhaev, M. N., Isaev, M. I. (2006). Tyrosinase inhibition studies of cycloartane and cucurbitane glycosides and their structure-activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(17): 6085-6088.
- Kharazian, N. (2013). Identification of flavonoids in leaves of seven wild growing *Salvia* L. (Lamiaceae) species from Iran. *Progress in Biological Sciences*, 3(2): 81-98.

- Kharazian, N. (2014). Flavonoid constituents in some species of *Salvia* L. (Lamiaceae) in Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 25(3): 219-227.
- Khomdram, S. D., Singh, P. K. (2011). Polyphenolic compounds and free radical scavenging activity in eight Lamiaceae herbs of Manipur. *Notulae Scientia Biologicae*, 3(2): 108-113.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13): 3713-3717.
- Kim, Y. J., Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15): 1707-1723.
- Kivrak, ., Duru, M. E., Öztürk, M., Mercan, N., Harmandar, M., Topçu, G. (2009). Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry*, 116(2): 470-479.
- Kolak, U., Ari, S., Birman, H., Hasancebi, S., Ulubelen, A. (2001). Cardioactive diterpenoids from the roots of *Salvia amplexicaulis*. *Planta medica*, 67(8): 761-762.
- Kontogianni, V., Tomi, G., Nikoli, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stošić-Grujić, S., Stojanović, I., Gerothanassis, I. P., Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry* 136: 120-129.
- Koçar, M., Göger, F., Başer, K.H.C. (2011). *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia halophila* Hedge from Turkey. *Food Chemistry*, 129: 374-379.
- Kovačević, N. (2002). *Osnovi farmakognozije*, Srpska školska knjiga, Beograd.
- Koyuncu, O., Erkara, I. P., Ardiç, M. (2009). Anatomy and palynology of *Salvia verticillata* subsp. *verticillata* L.(Lamiaceae), a red-listed species in Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*, 38(2): 197-200.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3): 217-233.
- Krstić, L., Malenčić, D., Anačkov, G. (2006). Structural investigations of trichomes and essential oil composition of *Salvia verticillata*. *Botanica Helvetica*, 116(2): 159-168.

- Kumar, S., Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013: 1-16.
- Lakuši , B., Stevanovi , B., Jan i , R., & Lakuši , D. (2010). Habitat-related adaptations in morphology and anatomy of *Teucrium* (Lamiaceae) species from the Balkan peninsula (Serbia and Montenegro). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(10): 633-646.
- Lakuši , B. S., Risti , M. S., Slavkovska, V. N., Stojanovi , D. L., Lakuši , D. V. (2013). Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. *Botanica Serbica*, 37(2): 127-139.
- Lange, B. M., Turner, G. W. (2013). Terpenoid biosynthesis in trichomes - current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal*, 11(1): 2-22.
- Lawton, B. P. (2002). *Mints: a family of herbs and ornamentals*. Timber Press.
- Lee, K. T., Kim, B. J., Kim, J. H., Heo, M. Y., Kim, H. P. (1997). Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International journal of cosmetic science*, 19(6): 291-298.
- Lee, K. A., Moon, S. H., Kim, K. T., Mendonca, A. F., Paik, H. D. (2010). Antimicrobial effects of various flavonoids on *Escherichia coli* O157: H7 cell growth and lipopolysaccharide production. *Food Science and Biotechnology*, 19(1): 257-261.
- Lee, C. J., Chen, L. G., Chang, T. L., Ke, W. M., Lo, Y. F., Wang, C. C. (2011a). The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food chemistry*, 124(3): 833-841.
- Lee, S. R., Shin, H. H., Jeong, J.H., Hwang, K. T., Kim, T. Y. (2011b). Effect of ethanol concentrations and extraction time on acanthoside-D and total polyphenol contents and antioxidant activities in ethanol extracts of eleuthero. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24): 5700-5705.
- Lee, K. A., Kim, K. T., Chang, P. S., Paik, H. D. (2014). *In vitro* cytotoxic activity of ginseng leaf/stem extracts obtained by subcritical water extraction. *Journal of ginseng research*, 38(4): 289-292.

- Li, H. B., Wong, C. C., Cheng, K. W., Chen, F. (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3): 385-390.
- Li, W., Liu, M., Xu, Y. F., Feng, Y., Che, J. P., Wang, G. C., Zheng, J. H. (2014). Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. *Oncology reports*, 31(1): 117-124.
- Li, B., Zhang, C., Peng, L., Liang, Z., Yan, X., Zhu, Y., Liu, Y. (2015). Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected *Salvia* species measured by GC-MS and HPLC methods. *Industrial Crops and Products*, 69: 329-334.
- Lin, C. C., Yang, C. H., Wu, P. S., Kwan, C. C., Chen, Y. S. (2011). Antimicrobial, anti-tyrosinase and antioxidant activities of aqueous aromatic extracts from forty-eight selected herbs. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5(26): 6203-6209.
- Livermore, D. M. (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*, 8(4): 557-584.
- Loizzo, M. R., Saab, A. M., Tundis, R., Menichini, F., Bonesi, M., Piccolo, V., Statti, G. A., de Cindio, B., Houghton, P. J., Menichini, F. (2008). *In vitro* inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 119(1): 109-116.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A., Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer research*, 27: 3293-3299.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F. (2012). Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(4): 378-398.
- Lu, Y., Foo, L.Y. (1999). Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 51: 91-94.
- Lu, Y., Foo, L. Y. (2000). Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 55(3): 263-267.

- Lu, Y., Foo, L.Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). Food Chemistry, 75: 197-202.
- Lu, Y., Foo, L.Y. (2002). Polyphenolics of *Salvia* - a review. Phytochemistry, 59: 117-140.
- Ma ukanovi -Joci , M. (2010). Biologija medonosnog bilja sa atlasom apiflore Srbije. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
- Ma ukanovi -Joci , M., Duleti -Lauševi , S., Daji -Stevanovi , Z. (2012). Micromorphological and anatomical analysis of *Salvia officinalis* floral nectaries. Proceedings of the Seventh Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, pp. 23-26.
- Malen i , , Couladis, M., Mimica-Duki , N., Popovi , M., Boža, P. (2004). Essential oils of three *Salvia* species from the Pannonian part of Serbia. Flavour and Fragrance Journal, 19: 225-228.
- Marin, P. (1996). Orašice i trihome u familiji Lamiaceae. Biološki fakultet, Beograd.
- Marin, P. D. (2003). Biohemijska i molekularna sistematika biljaka, NNK International, Beograd.
- Martins, A., Hajdú, Z., Vasas, A., Csupor-Löffler, B., Molná, J., Hohmann, J. (2010). Spathulenol inhibit the human ABCB1 efflux pump, Planta Medica, 76, p. 608.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. Food chemistry, 170: 378-385.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 69: 197-201.
- Matkowski, A., Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. Fitoterapia, 77(5): 346-353.
- Matkowski, A., Tasarz, P., Szypuła, E. (2008a). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. Journal of Medicinal Plants Research, 11: 321-330.
- Matkowski, A., Zieli ska, S., Oszmia ski, J., Lamer-Zarawska, E. (2008b). Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L. Bioresource technology, 99(16): 7892-7896.

- Matevski, V. *Salvia* L., Flora na Republika Makedonija, 2 (2) MANU, Skopje (In preparation).
- Mauricio, R., Rausher, M. D. (1997). Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution*, 51(5): 1435-1444.
- Mayekiso, B., Mhinana, Z., Magwa, M. L. (2009). The structure and function of trichomes in the leaf of *Salvia repens* Burch. Ex Benth. *African Journal of Plant Science*, 3: 190-199.
- Mayer, B., Baggio, C. H., Freitas, C. S., dos Santos, A. C., Twardowschy, A., Horst, H., Pizzolatti, M. G., Micke, G. A., Heller, M., dos Santos, É. P., Otuki, M.F. (2009). Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. *Fitoterapia*, 80(7): 421-426.
- McFadden, R., President, V., Services, T., Laboratories, D., Oregon, W. (2003). The Usual Suspects: Microbes, Biohazards and Pathogens. *Coastwide Laboratories*.
- Metwally, A. M., Omar, A. A., Harraz, F. M., El Sohafy, S. M. (2010). Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacognosy magazine*, 6(23): 212-218.
- Miguel, M. G., 2010. Antioxidant activity of aromatic and medicinal plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 291-312.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnovi, D., Kiti, D., Jovanovi, V., Miti, V., Stojanovi-Radi, Z., Zlatkovi, B. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidative and anticholinesterase activity of *Satureja montana* L. ssp *montana* essential oil. *Open Life Sciences*, 9(7): 668-677.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2): 231-237.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84: 407-412.
- Millet, Y., Jouglard, J., Steinmetz, M. D., Tognetti, P., Joanny, P., Arditti, J. (1981). Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study, *Clinical Toxicology*, 18(12): 1485-1498.

- Mimica-Duki , N., Božin, B., Sokovi , M., Mihajlovi , B., Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Medica*, 69: 413-419.
- Mimica-Duki , N., Božin, B., Sokovi , M., Simin, N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L.(Lamiaceae) essential oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(9): 2485-2489.
- Mirza, M., Sefidkon, F. (1999). Essential oil composition of two *Salvia* species from Iran, *Salvia nemorosa* L. and *Salvia reuterana* Boiss. *Flavour and Fragrance Journal*, 14: 230-232.
- Miti - ulafi , D., Vukovi -Ga i , B. S., Kneževi -Vuk evi , J. B., Stankovi , S., Simi , D. M. (2005). Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Archives of Biological Sciences*, 57(3): 173-178.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219.
- Moon, H. K., Vinckier, S., Smets, E., Huysmans, S. (2008a). Palynological evolutionary trends within the tribe Mentheae with special emphasis on subtribe Menthinae (Nepetoideae: Lamiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 275: 93-108.
- Moon, H. K., Vinckier, S., Walker, J. B., Smets, E., Huysmans, S. (2008b). A search for phylogenetically informative pollen characters in the subtribe Salviinae (Mentheae: Lamiaceae). *International journal of plant sciences*, 169(3): 455-471.
- Moon, H. K., Hong, S. P., Smets, E., Huysmans, S. (2009). Phylogenetic significance of leaf micromorphology and anatomy in the tribe Mentheae (Nepetoideae: Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160(2): 211-231.
- Moon, S. S., Rahman, A. A., Manir, M., Ahamed, V. J. (2010). Kaempferol glycosides and cardenolide glycosides, cytotoxic constituents from the seeds of *Draba nemorosa* (Brassicaceae). *Archives of pharmacal research*, 33(8): 1169-1173.
- Mosafa, E., Yahyaabadi, S., Doudi, M. (2014). *In vitro* antibacterial properties of sage (*Salvia officinalis*) ethanol extract against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 16(10): 42-46.



- Mosmann, T. (1985). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 165: 55-63.
- Mousavi, S. M., Jafari, A., Najafi, S. (2013). Nutlet micromorphological study on *Salvia* L. (Lamiaceae) from NE Iran. *American Journal of Plant Sciences*, 4(7), 1457-1460.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., Bellumori, M., Giaccherini, C., Martini, V., Michelozzi, M. (2011). Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study. *Talanta*, 85(1): 167-176.
- Muráriková, A., Kaffková, K., Raab, S., Neugebauerová, J. (2015). Evaluation of content of phenolics in *Salvia* species cultivated in South Moravian Region. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, 62: 18-22.
- Nasri, Z. (2012). Operational conditions effects on extraction yield of antioxidants from Iranian rosemary plant. *Advanced Engineering Materials*, (2012): 980-984.
- Navarro, T., El Oualidi, J. (2000). Trichome morphology in *Teucrium* L. (Labiatae). A taxonomic review. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 57: 277-297.
- NCCLS. (1998). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: proposed standard M38-P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food control*, 20(2): 157-160.
- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database, doi: 10.1093/database/bap024
- Nickavar, B., Kamalinejad, M., Izadpanah, H. (2007). *In vitro* free radical scavenging activity of five *Salvia* species. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(4): 291-294.
- Nikaido, H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 178(20): 5853-5859.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4): 593-656.

- Nikoli , M., Glamo lija, J., Ferreira, I.C., Calhelha, R.C., Fernandes, Â., Markovi , T., Markovi , D., Giweli, A., Sokovi , M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52: 183-190.
- Nikolova, M. T., Grayer, R. J., Genova, E., Porter, E. A. (2006). Exudate flavonoids from Bulgarian species of *Salvia*. *Biochemical systematics and ecology*, 34(4): 360-364.
- Nikolova, M. (2011). Screening of radical scavenging activity and polyphenol content of Bulgarian plant species. *Pharmacognosy research*, 3(4): 256-259.
- Nugroho, A., Kim, M. H., Choi, J., Baek, N. I., Park, H. J. (2012). *In vivo* sedative and gastroprotective activities of *Salvia plebeia* extract and its composition of polyphenols. *Archives of pharmacal research*, 35(8): 1403-1411.
- Nussbaum, R. L., Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14): 1356-1364.
- Ojewole, J. A. O. (2005). Antinociceptive, antiinflammatory and antidiabetic effects of *Leonotis leonurus* (L.) R. BR. (Lamiaceae) leaf aqueous extract in mice and rats. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 27(4): 257-264.
- Okuhata, H., Ikeda, K., Miyasaka, H., Takahashi, S., Matsui, T., Nakayama, H., Kato, K., Hirata, K. (2010). Floricultural *Salvia* plants have a high ability to eliminate bisphenol A. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(1): 99-101.
- Omwenga, E. O., Hensel, A., Shitandi, A., Goycoolea, F. M. (2015). Ethnobotanical survey of traditionally used medicinal plants for infections of skin, gastrointestinal tract, urinary tract and the oral cavity in Borabu sub-county, Nyamira county, Kenya. *Journal of ethnopharmacology*, 176: 508-514.
- Orhan, I, Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yilmaz, G., Kan, Y., Konuklugil, B., Sener, B., Choudhary, M. I. (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*, 103: 1247-1254.
- Orhan, I, Kartal, M., Kan, Y., ener, B. (2008). Activity of essential oils and individual components against acetyl and butyrylcholinesterase. *Zeitschrift fuer Naturforschung C*, 63(7-8): 547-553.

- Orhan, I., Aslan, M. (2009). Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2): 327-332.
- Orhan, I. E., Senol, S., Öztürk, N., Akaydin G., Sener, B. (2012). Profiling of *in vitro* neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic *Salvia* species. *Food Chemistry*, 132(3): 1360-1367.
- Orhan, I. E., Senol, F. S., Ercetin, T., Kahraman, A., Çelep, F., Akaydin, G., Sener, B., Dogan, M. (2013). Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Industrial Crops and Products*, 41: 21-30.
- Özdemir, C., Senol, G. (1999). The morphological, anatomical and karyological properties of *Salvia sclarea* L. *Turkish Journal of Botany*, 23(1), 7-18.
- Özdemir, C., Baran, P., Akta, K. (2009). Anatomical studies in *Salvia viridis* L. (Lamiaceae). *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 16(1): 65-71.
- Özkan, M., Soy, E. (2007). Morphology, anatomy, hair and karyotype structure of *Salvia blepharocleana* Hedge and Hub.-Mor. (Lamiaceae) endemic to Turkey. *Pakistan Journal of biological sciences*, 10(6): 893-898.
- Özkan, M. (2008). Glandular and eglandular hairs of *Salvia recognita* Fisch. & Mey. (Lamiaceae) in Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*, 37(1): 93-95.
- Özkan, M., Özdemir, C., Soy, E. (2008). Morphological, anatomical and karyological properties of *Salvia cadmica* (Lamiaceae) endemic to Anatolia. *Flora Meditteranea*, 18: 361-371.
- Özkan, M., Akta, K., Özdemir, C., Guerin, G. (2009). Nutlet morphology and its taxonomic utility in *Salvia* (Lamiaceae: Mentheae) from Turkey. *Acta Botanica Croatica*, 68(1): 105-115.
- Özkan, A., Erdogan, A. (2011). A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biology*, 35(6): 735-742.
- Özler, H., Pehlivan, S., Kahraman, A., Dogan, M., Çelep, F., Baer, B., Yavru, A., Bagherpour, S. (2011). Pollen morphology of the genus *Salvia* L. (Lamiaceae) in Turkey. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(4): 316-327.

- Panda, H. (2003). The Complete Technology Book on Herbal Perfumes & Cosmetics. National Institute Of Industri.
- Park, Y. K., Koo, M. H., Ikegaki, M., Contado, J. L. (1997). Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 40: 97-106.
- Pavela, R. (2008). Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, 102(3): 555-559.
- Pavela, R., Neugebauerová, J. (2008). Screening of insecticidal activity of some *Salvia* species on *Spodoptera littoralis* Boisduval larvae. *Proceedings of the Fifth Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*, pp. 27.
- Pérez-Bonilla, M., Salido, S., Sánchez, A., van Beek, T. A., Altarejos, J. (2013). Effect of extraction conditions on the antioxidant activity of olive wood extracts. *International Journal of Food Science*, 2013: 1-13.
- Perez-Hernandez, N., Ponce-Monter, H., Medina, J. A., Joseph-Nathan, P. (2008). Spasmolytic effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 30-35.
- Perry, N. S., Court, G., Bidet, N., Court, J., Perry, E. (1996). European herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy. *International journal of geriatric psychiatry*, 11(12): 1063-1069.
- Perry, N. S., Houghton, P. J., Theobald, A., Jenner, P., Perry, E. K. (2000). *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 52(7): 895-902.
- Perry, N. S., Bollen, C., Perry, E. K., Ballard, C. (2003). *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3): 651-659.
- Petanidou, T., Goethals, V., Smets, E. (2000). Nectary structure of Labiatae in relation to their nectar secretion and characteristics in a Mediterranean shrub community - Does flowering time matter? *Plant Systematics and Evolution*, 225(1-4): 103-118.

- Petkovi B., Merkulovi , Lj., Duleti -Lauševi , S. (2005). Anatomija biljaka sa praktikumom, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Petrovi , S., Pavlovi , M., Tzakou, O., Couladis, M., Milenkovi , M., Vu i evi , D., Niketi , M. (2009). Composition and antimicrobial activity of *Salvia amplexicaulis* Lam. essential oil. Journal of Essential Oil Research, 21: 33-36.
- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy reviews, 6(11): 1-5.
- Pfaller, J. B., Messer, S. A., Hollis, R. J., Diekema, D. J., Pfaller, M. A. (2003). *In vitro* susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. Journal of clinical microbiology, 41(3): 1126-1129.
- Pierozan, M. K., Pauletti, G. F., Rota, L., Santos, A. C. A. D., Lerin, L. A., Di Luccio, M., Mossi, A. J., Atti-Serafini, L., Cansian, R. L., Oliveira, J. V. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. Food Science and Technology, 29(4): 764-770.
- Pitarokili, D., Tzakou, O., & Loukis, A. (2006). Essential oil composition of *Salvia verticillata*, *S. verbenaca*, *S. glutinosa* and *S. candidissima* growing wild in Greece. Flavour and fragrance journal, 21(4): 670-673.
- Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E., Conte, L. S. (2002). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82(14): 1645-1651.
- Prasad, N. R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., Reddy, B. V. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. Molecular and cellular biochemistry, 349(1-2): 11-19.
- Quintans-Júnior, L., Moreira, J.C., Pasquali, M.A., Rabie, S., Pires, A.S., Schröder, R., Rabelo, T.K., Santos, J., Lima, P.S., Cavalcanti, S.C., Araújo, A.A. (2013). Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes. ISRN toxicology, 2013: 1-11.
- Raja, R. R. (2012). Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview. Research Journal of Medicinal Plant, 6(3): 203-213.

- Raut, J. S., Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62: 250-264.
- Ray, G., Leelamanit, W., Sithisarn, P., Jiratchariyakul, W. (2014). Antioxidative compounds from *Aquilaria crassna* leaf. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(4): 54-58.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9): 1231-1237.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11): 1603-1616.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4): 152-159.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43: 827-831.
- Rodrigues, M. R. A., Kanazawa, L. K. S., das Neves, T. L. M., da Silva, C. F., Horst, H., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R. S., Baggio, C. H., de Paula Werner, M. F. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 139(2): 519-526.
- Roldán, L. P., Díaz, G. J., Durringer, J. M. (2010). Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(4): 451-461.
- Roseiro, L. B., Rauter, A. P., Serralheiro, M. L. M. (2012). Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. *Nutrition and Aging*, 1(2): 99-111.

- Rostelien, T., Borg-Karlson, A. K., Fäldt, J., Jacobsson, U., Mustaparta, H. (2000). The plant sesquiterpene germacrene D specifically activates a major type of antennal receptor neuron of the tobacco budworm moth *Heliothis virescens*, *Chemical Senses*, 25: 141-148.
- Rozza, A. L., Pellizzon, C. H. (2013). Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(1): 51-63.
- Ruiters, A. K., Tilney, P. M., Van Vuuren, S. F., Viljoen, A. M., Kamatou, G. P. P., Van Wyk, B. E. (2016). The anatomy, ethnobotany, antimicrobial activity and essential oil composition of southern African species of *Teucrium* (Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 102: 175-185.
- Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Cardile, V., Arnold, N. A., Senatore, F. (2016). Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three lebanese *Salvia* species. *Industrial Crops and Products*, 83: 492-499.
- Ryding, O. (2010). Pericarp structure and phylogeny of tribe Mentheae (Lamiaceae). *Plant systematics and evolution*, 285(3-4): 165-175.
- Rzepa, J., Wojtal, Ł., Staszek, D., Grygierczyk, G., Labe, K., Hajnos, M., Kowalska, T., Waksmundzka-Hajnos, M. (2009). Fingerprint of selected *Salvia* species by HS-GC-MS analysis of their volatile fraction. *Journal of chromatographic science*, 47(7): 575-580.
- ahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7): 549-557.
- Sajewicz, M., Staszek, D., Wojtal, Ł., Kowalska, T., Hajnos, M. L., Waksmundzka-Hajnos, M. (2011). Binary HPLC-diode array detector and HPLC-evaporative light-scattering detector fingerprints of methanol extracts from the selected sage (*Salvia*) species. *Journal of AOAC International*, 94(1): 71-76.
- Sajewicz, M., Staszek, D., Wróbel, M. S., Waksmundzka-Hajnos, M., Kowalska, T. (2012). The HPLC/DAD fingerprints and chemometric analysis of flavonoid extracts from the selected sage (*Salvia*) species. *Chromatography Research International*, 2012: 1-8.

- Salimpour, F., Ebrahimiyan, M., Sharifnia, F., Tajadod, G. (2012). Numerical taxonomy of eight *Salvia* L. species using anatomical properties. *Annals of Biological Research*, 3(2): 795-805.
- Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42: 321-324.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N. S. L., Wilkins, R. M., Perry, E. K. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3): 661-668.
- Šavikin, K., Risti, M., Zduni, G., Stevi, T., Menkovi, N. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Salvia ringens* Sibth. et Sm. var. *baldacciana* Briq. *The Journal of Essential Oil Research*, 20: 363-365.
- Schmiderer, C., Grassi, P., Novak, J., Weber, M., Franz, C. (2008). Diversity of essential oil glands of clary sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae). *Plant Biology*, 10(4): 433-440.
- Sefidkon, F., Khajavi, M. S. (1999). Chemical composition of the essential oils of two *Salvia* species from Iran: *Salvia verticillata* L. and *Salvia santolinifolia* Boiss. *Flavour and fragrance journal*, 14(2): 77-78.
- Sefidkon, F., Mirza, M. (1999). Chemical composition of the essential oils of two *Salvia* species from Iran, *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia syriaca* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(1): 45-46.
- enol, F. S., Orhan, I., Çelep, F., Kahraman, A., Dogan, M., Yilmaz, G., ener, B. (2010a). Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory. *Food Chemistry*, 120: 34-43.
- enol, F. S., Orhan, I., Yilmaz, G., Cicek, M., ener, B. (2010b). Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibition studies and antioxidant activities of 33 *Scutellaria* L. taxa from Turkey. *Food and chemical toxicology*, 48(3): 781-788.
- Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., Ciarallo, G. (1997). Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany*, 79: 329-336.



- Shahrzad, K., Mahya, N., Fatemeh, T. B., Maryam, K., Mohammadreza, F. B., Jahromy, M. H. (2014). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Salvia officinalis* L. hydroalcoholic extract in male rats. *Chinese Medicine*, 5(2): 1-7.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., Corke, H. (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1): 112-119.
- Shirsat, R., Kokate, P., & Surdakar, S. (2012). Morphological and anatomical characterization of *Salvia plebeia* from Maharashtra (India). *Bioscience Discovery*, 3(2): 165-168.
- Siebert, D. J (2004). Localization of salvinatorin A and related compounds in glandular trichomes of the psychoactive sage, *Salvia divinorum*. *Annals of Botany*, 93: 763-771.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colometric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Sivasothy, Y., Sulaiman, S. F., Ooi, K. L., Ibrahim, H., Awang, K. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of flavonoids and curcuminoids from *Zingiber spectabile* Griff. *Food Control*, 30(2): 714-720.
- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 45(8): 3197-3201.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53: 46-54.
- Smith, D. R. (2003). Country study for biodiversity of the Republic of Macedonia: (first national report). Ministry of Environment and Physical Planning, Skopje.
- Sokovi , M., Brki , D., Džami , A. Risti , M., S., Marin, P. D. (2009). Chemical composition and antifungal activity of *Salvia desoleana* Atzei & Picci essential oil and its major components. *Flavour and fragrance journal*, 24(2): 83-87.
- Sokovi , M. D., Glamo lija, J. M., iri , A. D. (2013). Natural Products from Plants and Fungi as Fungicides, In: Nita, M. (Ed.), *Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*, In Tech, pp.185-232.

- Solowey, E., Lichtenstein, M., Sallon, S., Paavilainen, H., Solowey, E., Lorberboum-Galski, H. (2014). Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-12.
- Sonboli, A., Babakhani, B., Mehrabian, A. R. (2006). Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(3-4): 160-164.
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., LLeonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*, 12(1): 376-390.
- Spigno, G., De Faveri, D. M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3): 793-801.
- Srivastava, J. K., Gupta, S. (2007). Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(23): 9470-9478.
- Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 4115-4124.
- Stankovi, M. S., Topuzovi, M., Soluji, S., Mihailovi, V. (2010). Antioxidant activity and concentration of phenols and flavonoids in the whole plant and plant parts of *Teucrium chamaedrys* L. var. *glanduliferum* Haussk. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 2092-2098.
- Stankovi, M. S., Niciforovi, N., Topuzovi, M., Soluji, S. (2011a). Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. var. *montanum*, f. *supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1): 2222-2227.
- Stankovi, M. S., ur i, M. G., Žiži, J. B., Topuzovi, M. D., Soluji, S. R., Markovi, S. D. (2011b). *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *International journal of molecular sciences*, 12(7): 4190-4205.

- Stevi , T., Stankovi , S., Šavikin, K., Go evac, D., Dimki , I., Sokovi , M., Beri , T. (2014). Chemical composition and inhibitory activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plants. *Lekovite sirovine*, 34(34): 69-80.
- Suffness, M., Pezzuto, J. M. (1990). Assays related to cancer drug discovery, In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press, London, pp. 71-133.
- Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6): 2167-2180.
- Suntar, ., Akkol, E. K., enol, F. S., Keles, H., Orhan, I. E. (2011). Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using *in vivo* and *in vitro* experimental models. *Journal of ethnopharmacology*, 135(1): 71-77.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9): 1199-1218.
- Talib, W. H., Mahasneh, A. M. (2010). Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Scientia pharmaceutica*, 78(1): 33-45.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3): 1089-1099.
- Taskova, R., Mitova, M., Evstatieva, L., An ev, M., Peev, D., Handjieva, N., Bankova, V., Popov, S. (1997). Iridoids, flavonoids and terpenoids as taxonomic markers in Lamiaceae, Scrophulariaceae and Rubiaceae. *Bocconea*, 5: 631-636.
- Tatsimo, S. J. N., de Dieu Tamokou, J., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., Kuate, J.R. and Tane, P. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research notes*, 5(1): 158.
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104(4): 1372-1378.
- Taylor, R. (1990). Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *JDMS*, 1: 35-39.

- Tel, G., Öztürk, M., Duru, M. E., Harmandar, M., Topçu, G. (2010). Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food and chemical toxicology*, 48(11): 3189-3193.
- Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Sokmen, A., (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food chemistry*, 84(4): 519-525.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food chemistry*, 90(3): 333-340.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, 95(2): 200-204.
- Tepe, B. (2008). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Technology*, 99(6): 1584-1588.
- Tiveron, A. P., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Vieira, T. M., Regitano-d'Arce, M. A., Alencar, S. M. (2012). Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. *International journal of molecular sciences*, 13(7): 8943-8957.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1(1): 98-106.
- Todorova, M., Trendafilova, A. (2014). *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *Journal of ethnopharmacology*, 152(2): 256-265.
- Topçu, G., Gören, A. C. (2007). Biological activity of diterpenoids isolated from Anatolian Lamiaceae plants. *Records of Natural Products*, 1(1): 1-16.
- Topçu, G., Öztürk, M., Ku man, T., Demirköz, A. A. B., Kolak, U., Ulubelen, A. (2013). Terpenoids, essential oil composition, fatty acid profile, and biological activities of Anatolian *Salvia fruticosa* Mill. *Turkish Journal of Chemistry*, 37(4): 619-632.

- Topcu, G., Kusman, T. (2014). Lamiaceae family plants as a potential anticholinesterase source in the treatment of Alzheimer's disease, *Bezmialem Science*, 1: 1-25.
- Tosun, M., Ercisli, S., Sengul, M., Ozer, H., Polat, H., Ozturk, E. (2009). Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biological Research*, 42: 175-181.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., Bonesi, M., Colica, C., Menichini, F. (2011). *In vitro* cytotoxic activity of extracts and isolated constituents of *Salvia leriifolia* Benth. against a panel of human cancer cell lines. *Chemistry & biodiversity*, 8(6): 1152-1162.
- Tusevski, O., Kostovska, A., Iloska, A., Trajkovska, L., Simi, S. (2014). Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Open Life Sciences*, 9(9): 888-900.
- Tzakou, O., Pitarokili, D., Chinou, I. B., Harvala, C. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*. *Planta Medica*, 67(1): 81-83.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Eri, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., Bozok-Johansson, C. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, 36(4): 971-974.
- Ulubelen, A. (2003). Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry*, 64(2): 395-399.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Kolak, U. (2005). Labiatae flavonoids and their bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30: 233-302.
- Ustun, O., Sezik, E. (2011). Analgesic activity of *Salvia wiedemannii* Boiss. used in Turkish folk medicine. *Records of Natural Products*, 5(4), 328-331.
- Valant-Vetschera, K. M., Roitman, J. N., Wollenweber, E. (2003). Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the Lamiaceae. *Biochemical systematics and ecology*, 31(11): 1279-1289.
- Valdés, L. J. (1994). *Salvia divinorum* and the unique diterpene hallucinogen, Salvinorin (divinorin) A. *Journal of psychoactive drugs*, 26(3): 277-283.
- Vallianou, I., Peroulis, N., Pantazis, P., Hadzopoulou-Cladaras, M. (2011). Camphene, a plant-derived monoterpene, reduces plasma cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic rats independently of HMG-CoA reductase activity. *PloS one*, 6(11), e20516.

- Veit, M., Beckert, C., Hohne, C., Bauer, K., Geiger, H. (1995). Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry* 38: 881-891.
- Veli kovi , D. T., Ran elovi , N. V., Risti , M. S., Šmelcerovi , A. A., Veli kovi , A. S. (2002). Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *Salvia pratensis* L., *Salvia glutinosa* L. and *Salvia aethiopsis* L. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 67(10): 639-646.
- Veli kovi , D., Randjelovi , N., Risti , M., Veli kovi , A., Šmelcerovi , A. (2003). Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 68: 17-24.
- Veli kovi , D., Nikolova, M., Ivancheva, Stojanovi , J., Veljkovi , V. (2007). Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage by ultrasonic and classical maceration. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72: 73-80.
- Veli kovi , D., Risti , M., Milosavljevi , M., Karabegovi , I., Lazi , M., Stoji evi , S. (2012). Chemical composition of the essential oils of *Salvia austriaca* Jacq. and *Salvia amplexicaulis* Lam. from Serbia. *Agro Food industry Hi Tech*, 23: 8-10.
- Venkateshappa, S. M., Sreenath, K. P. (2013). Some species of Lamiaceae - comparative anatomical studies. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3(11): 9249-9254.
- Verma, R. S., Padalia, R. C., Chauhan, A. (2015). Harvesting season and plant part dependent variations in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. grown in northern India. *Journal of Herbal Medicine*, 5(3): 165-171.
- Vladimir-Kneževi , S., Blažekovi , B., Kindl, M., Vladi , J., Lower-Nedza, A. D., Brantner, A. H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules*, 19(1): 767-782.
- Vlaisavljevi , S. (2014). Hemijska, biohemijska i mikrobiološka karakterizacija *Trifolium pratense* L. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matemati ki fakultet.
- Wagner, G. J (1991). Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology*. 96: 675-679.

- Wagner, G. J., Wang, E., Shepherd, R. W. (2004). New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*, 93(1): 3-11.
- Wahle, K. W., Brown, I., Rotondo, D., Heys, S. D. (2010). Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698: 36-51.
- Walker, J. B., Sytsma, K. J., Treutlein, J., Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany*, 91(7): 1115-1125.
- Walker, J.B., Sytsma, K.J. (2007). Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany*, 100: 375-391.
- Wang, K. H., Lin, R. D., Hsu, F. L., Huang, Y. H., Chang, H. C., Huang, C. Y., Lee, M. H. (2006). Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3): 353-359.
- Wang, B. Q. (2010). *Salvia miltiorrhiza*: chemical and pharmacological review of a medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25): 2813-2820.
- Wendakoon, C., Calderon, P., Gagnon, D. (2012). Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(2): 60-68.
- Werker, E., Ravid, U., Putievsky, E. (1985). Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany*, 34: 31-45.
- Werker, E. (1993). Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae—a review. *Flavour and Fragrance Journal*, 8(5): 249-255.
- Werker, E. (2000). Trichome diversity and development. *Advances in botanical research*, 31: 1-35.
- Wester, P., Claßen-Bockhoff, R. (2006). Bird pollination in South African *Salvia* species. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 201(5): 396-406.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1): 3-19.

- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3): 940-949.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1): 217-224.
- Xavier, C. P., Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2009a). *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutrition and cancer*, 61(4): 564-571.
- Xavier, C. P., Lima, C. F., Preto, A., Seruca, R., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2009b). Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer letters*, 281(2): 162-170.
- Xiang, C. L., Dong, Z. H., Peng, H., Liu, Z. W. (2010). Trichome micromorphology of the East Asiatic genus *Chelonopsis* (Lamiaceae) and its systematic implications. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(7): 434-441.
- Xie, Y., Yang, W., Chen, X., Xiao, J. (2014). Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure–activity relationship. *Food & function*, 5(10): 2582-2589.
- Yáñez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-García, O., Canteras, M., Lozano Teruel, J. A. (2004). Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition and cancer* 49(2): 191-199.
- Yugoslavian Pharmacopoeia, Pharmacopoea Jugoslavica editio quarta. Ph. Jug. IV (1984). National institute for Health Protection, Belgrade, Serbia.
- Zgórka, G., Głowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 26(1): 79-87.
- Zhang, X., Sawhney, V. K., Davis, A. R. (2014). Annular floral nectary with oil-producing trichomes in *Salvia farinacea* (Lamiaceae): Anatomy, histochemistry, ultrastructure, and significance. *American journal of botany*, 101(11): 1849-1867.



- Ziaei, A., Ramezani, M., Wright, L., Paetz, C., Schneider, B., Amirghofran, Z. (2011). Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. *Phytotherapy Research*, 25(4): 557-562.
- Žiži , J., Vukovi , N., Jadranin, M., An elkovi , B., Teševi , V., Kacaniova, M., Sukdolak, S., Markovi , S. (2013). Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 3001-3009.
- Žižovic, I., Miši , D., Ašanin, R., Ivanovi , J. (2009). Antibacterial activity of essential oils of some Lamiaceae family species isolated by different methods. *Zbornik radova Tehnološkog fakulteta u Leskovcu*, 19: 20-26.
- Zupkó, I., Hohmann, J., Redei, D., Falkay, G., Janicsak, G., Máthé, I. (2001). Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. *Planta Medica*, 67(4): 366-368.

Ukupno 430 literaturnih navoda

### Linkovi za fotografije koriš ene u radu:

**Datum pristupa web-stranici: 14.06.2016.**

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salvia\\_officinalis.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salvia_officinalis.jpg)  
<https://www.flickr.com/photos/valdelobos/4353855486>  
<https://www.flickr.com/photos/dragon-lady/973091901>  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salvia\\_fruticosa\\_1.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salvia_fruticosa_1.jpg)  
<http://robinsyard.blogspot.rs/2012/07/salvia-fruticosa.html>  
[https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Salvia\\_sclarea01.jpg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Salvia_sclarea01.jpg)  
[http://www.diytrade.com/china/pd/11120779/Salvia\\_Miltiorrhiza\\_P\\_E\\_Cryptotanshinone.html](http://www.diytrade.com/china/pd/11120779/Salvia_Miltiorrhiza_P_E_Cryptotanshinone.html)  
[https://ast.wikipedia.org/wiki/Salvia\\_hispanica#/media/File:Chia\\_Seeds\\_macro\\_2.jpg](https://ast.wikipedia.org/wiki/Salvia_hispanica#/media/File:Chia_Seeds_macro_2.jpg)  
<http://www.digthedirt.com/plants/13030-annual-salvias-salvia-viridis-var-comata-marble-arch>  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salvia\\_splendens\\_in\\_Dalat\\_city\\_\(2\).JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salvia_splendens_in_Dalat_city_(2).JPG)  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salvia\\_elegans,\\_Ananas-Salbei.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salvia_elegans,_Ananas-Salbei.JPG)  
<http://robinsyard.blogspot.rs/2012/07/salvia-amplexicaulis.html>  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lamiaceae\\_-\\_Salvia\\_amplexicaulis.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lamiaceae_-_Salvia_amplexicaulis.jpg)  
[http://www.plant-world-seeds.com/store/view\\_seed\\_item/3750](http://www.plant-world-seeds.com/store/view_seed_item/3750)  
<http://www.robspants.com/plants/SalviJuris>  
[https://en.wikipedia.org/wiki/File:Lamiaceae\\_-\\_Salvia\\_ringens.JPG](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Lamiaceae_-_Salvia_ringens.JPG)

## **BIOGRAFIJA**

Ana Z. Alimpi je rođena 19.07.1986. u Šapcu gde je završila osnovnu školu i Šabačku gimnaziju. Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala 2005. godine, smer Biologija, a diplomirala je 6.10.2010. godine sa prosečnom ocenom 9,47.

Doktorske akademske studije je upisala 2010. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Eksperimentalna i primenjena botanika.

Od januara 2011. godine je angažovana na projektu Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom: „Mikromorfološka, fitohemijska i molekularna istraživanja biljaka - sistematski, ekološki i primenljivi aspekti“ (OI 173029) i zaposlena u zvanju istraživača - pripravnika na Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka Instituta za botaniku i Botaničku baštu „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od januara 2014. godine je izabrana u zvanje istraživača - saradnika.

Dosadašnji naučno-istraživački rad Ane Alimpi je iz oblasti morfologije, fitohemije i sistematike biljaka. Objavila je 9 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja u istožanosti sa 21 saopštenjem na međunarodnim naučnim skupovima, što ukupno čini 30 bibliografskih jedinica.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ана Алимпић

Број индекса Б3018/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Микроморфолошке карактеристике *Salvia amplexicaulis* Lam., *S. jurisicii* Košanin и *S. ringens* Sibth. & Sm. (Lamiaceae), хемијски састав и биолошка активност њихових етарских уља и екстраката“**

- 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.

У Београду, 5.7.2016.

Потпис аутора



---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Ана Алимпић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3018/2010 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ „Микроморфолошке карактеристике *Salvia amplexicaulis* Lam., *S. jurisicii* Košanin и *S. ringens* Sibth. & Sm. (Lamiaceae), хемијски састав и биолошка активност њихових етарских уља и екстраката“ \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ Соња Дулетић-Лаушевић \_\_\_\_\_

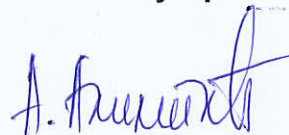
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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, 5.7.2016.



---

## Изјава о коришћењу

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

**„Микроморфолошке карактеристике *Salvia amplexicaulis* Lam., *S. jurisicii* Košanin и *S. ringens* Sibth. & Sm. (Lamiaceae), хемијски састав и биолошка активност њихових етарских уља и екстраката“**

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, 5.7.2016.

Потпис аутора



---

1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.