Fitokemijski i citogenetski profil odabranih biljaka roda Centaurea (Asteraceae)

Carev, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:779092

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivana Carev

PHYTOCHEMICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF SELECTED *CENTAUREA* SPECIES (*ASTERACEAE*)

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivana Carev

FITOKEMIJSKI I CITOGENETSKI PROFIL ODABRANIH BILJAKA RODA *CENTAUREA* (*ASTERACEAE*)

DOKTORSKI RAD

Mentor:
izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo

Zagreb, 2016.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivana Carev

PHYTOCHEMICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF SELECTED *CENTAUREA* SPECIES (*ASTERACEAE*)

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Olivera Politeo, Associate Professor

Zagreb, 2016.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Kemijsko-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Olivere Politeo te na Sveučilištu Paris Sud, Pariz i francuskom nacionalnom istraživačkom centru C.N.R.S. u Orsayu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Sonje Siljak Yakovlev. Dio istraživanja izrađen je u suradnji sa Prirodoslovno-matematičkim fakultetom u Splitu. Doktorski rad lektorirala je Dr. phil. Nikolina Palašić.

Doktorska disertacija jedan je od koraka na putu znanstvenog razvoja, učenje o tome kako se radi znanost i postaje izvrstan znanstvenik, no uz to što je velik i važan korak u znanstveno-istraživačkom razvoju njezinom se obranom završava i jedno važno razdoblje mog života. To razdoblje bilo je vrlo intezivno jer osim rada na doktoratu, znanstvenih istraživanja, usavršavanja i rada sa studentima po drugi put sam postala mama, pratila sam supruga na putu stjecanja njegove specijalizacije, djeca su nam krenula u vrtić, a starije dijete i u školu, selili smo se i vraćali nazad svojim korijenima, gdje smo izgradili i svoj vlastiti dom za svoju obitelj. Cijeli taj put obilježili su mnogi ljudi bez kojih danas ne bih bila to što jesam i gdje jesam, te im se ovim putem želim zahvaliti.

Zahvaljujem se na prvom mjestu svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Oliveri Politeo, na predloženoj temi za izradu doktorata, na vrijednim savjetima, iskustvu i znanju koje mi je pružila prilikom izrade i pisanja ovoga doktorskog rada. Hvala na slobodi koju sam dobila da učim i radim u skladu sa svojim željama i ambicijama te podršci da sve to i ostvarim na putu do stjecanja doktorata.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Sonji Siljak Yakovlev, koja me primila u svoj laboratorij na Sveučilištu Paris Sud, Pariz i francuskom nacionalnom istraživačkom centru C.N.R.S. u Orsayu na usavršavanje i znanstveno istraživanje. Svojim si me iznimnim razumijevanjem i strpljenjem te velikom podrškom i prijateljstvom zadužila da na svom putu promičem vjeru u ljude i plemenitost u prenošenju znanja i znanstvenih spoznaja.

Zahvaljujem se članicama povjerenstva za obranu doktorskog rada doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec (PMF, Zagreb) i dr. sc. Zrinki Kovarik (IMI, Zagreb) za uloženi trud u davanju komentara i korisnih savjeta kojima su omogućile da ovaj doktorski rad bude što kvalitetniji. Dr. sc. Zrinki Kovarik posebno hvala za sve trenutke na mom poslijediplomskom studiju u kojima mi je bila podrška i oslonac, hvala za sve dobronamjerne savjete i sugestije koje su bile usmjerene ka podizanju znanstvene kvalitete moga rada.

Prof. dr. sc. Mladenu Milošu posebno hvala što me primio u svoj tim, ukazao mi povjerenje i dao mi priliku da radim na njegovim znanstveno-istraživačkim projektima kroz koje sam izradila svoju doktorsku dizertaciju. Hvala na pruženoj prilici i podršci za sve ideje i aktivnosti koje sam imala, otvorili ste mi „vrata“ i podržali me da hrabro koračam stazama svijeta znanosti.

Dr Spenceru Brown i Dr Michaelu Bourge zahvaljujem na pomoći i savjetima prilikom citogenetskih istraživanja u Imagerie-Gif, Plateforme de Cytométrie, CNRS - I2BC, Gif sur Yvette, u Francuskoj. Zahvaljujem se na gostoprimstvu, pomoći i znanju koje ste mi prenijeli.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Mirku Ruščiću (PMF, Split) na sakupljanju i identificiranju biljnog materijala. Hvala ti na dugogodišnjem prijateljstvu i uspješnoj znanstveno-istraživačkoj suradnji.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Mirjani Skočibušić i posebno doc. dr. sc. Ani Maravić (PMF, Split) na nesebičnoj pomoći, iskustvu i savjetima pri testiranju anitmikrobnog učinka eteričnih ulja i pisanju ovoga doktorskog rada. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Nadi Bezić i izv. prof. dr. sc. Valeriji Dunkić (PMF, Split), koje su mi omogućile korištenje plinskog

kromatografa i spektrometra masa kao i njihovim suradnicima i laborantima, koji su olakšali i omogućili uspješna znanstvena istraživanja.

Zahvaljujem se kolegi dr. sc. Franku Burčulu na znanju i iskustvu koje mi je prenio, pomoći i savjetima u radu u laboratoriju, prijedlozima prilikom izrade ovog doktorskog rada, za sve trenutke u kojima sam se mogla osloniti na tebe – hvala ti!

Zahvaljujem se svim kolegama Zavoda za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta koji su mi omogućili rad u ugodnom okruženju i pomoć kad god mi je to trebalo, posebno onima koje još nisam spomenula: doc. dr. sc. Mili Radan i našim labotatorijskim tehničarima Nives Politeo, ing. i Vladi Jelaski Relji, ing.

Zahvaljujem se svim kolegama, posebno kolegama sa Zavoda za organsku kemiju i Zavoda za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu na pomoći i suradnji kroz cijelo vrijeme izrade ovog rada.

Zahvaljujem se kolegici mr. sc. Mejri Bektašević na sudjelovanju u dijelu eksperimentalnog rada, vjerujem da je to početak jedne vrlo uspješne suradnje i prijateljstva.

Hvala mojim studentima koji su sudjelovali u preliminarnim istraživanjima za ovaj doktorski rad: Lejli, Mariji, Petri, Mii, Ivani, Aniti i Ivanu, i mojim studentima na PMF-u u Zagrebu koji su mi olakšali rješavanje papirologije i bili pomoć i podrška kad god je trebalo: Anđela, Ani i Ante, hvala!

- ♦ -

Hvala mojim roditeljima, Kati i Anti Bogić, što su me svojim primjerom naučili da se poštenim radom i velikim zalaganjem i trudom u životu postiže puno. Hvala na vrijednostima i vještinama koje ste mi usadili i s kojima ste me uputili u život, neprocjenjive su! Mama, hvala što si bila uz mene kad mi je to trebalo, što si se s ljubavlju brinula za mene i moje najmilije da im nadomjestiš moju povremenu odsustnost zbog posla, bez tvoje podrške bilo bi mi višestruko teže.

Hvala svim ostalim članovima moje obitelji na koje sam se mogla osloniti na ovom dugom putovanju, prije svega mojoj svekrvi Zlati za čuvanje djece i brigu za njih kad god je to trebalo, svekru Peri, braći Ivi i Marku, sestri Mariji, nevjesti Mariji, djeveru Ivanu i Luciji što su svojim malim i velikim djelima složili mozaik moga puta.

Hvala mojoj teti Ivi i njezinoj obitelji, tetku Pašku, rođacima Viti i Antoniju, Marie, Luki i Emi što su mi iskazali iznimno gostoprimstvo za mog boravka u Parizu. Hvala što ste bili uz mene, olakšali mi boravak i pružili osjećaj doma i velike ljubavi daleko od vlastitog doma, hvala na svemu.

Hvala mojoj Gabrijeli i Josipu, i njihovoj Katarini i Gabrijelu za veliko prijateljstvo koje njegujemo već godinama, za toplo i velikodušno gostoprimstvo u svom domu kad bi dolazila u Zagreb, hvala za svu podršku i pomoć koju ste mi pružili; kad čovjek ima takve prijatelje, ima svo bogatstvo ovog svijeta.

Mojoj Nikolini, za svjetlo kojim me prati od prvog trena kad smo se upoznale, hvala što si moj oslonac, podrška i najbolja prijateljica. Hvala što si mi pomogla da budem to što jesam. Hvala na iskrenom prijateljstvu, velikoj ljubavi i podršci kad god mi je to bilo potrebno. Hvala za moju Maritu i Niku.

Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene, posebno onima koji su imali neizmjerno puno razumijevanja i strpljenja za moju odsustnost duhom i fizički, svatko je od vas, a ima vas zaista puno, na svoj način dao doprinos da danas budem tu gdje jesam.

Hvala mojim forumskim prijateljicama s kojima sam virtualna prijateljstva pretočila u prijateljstva u stvarnom svijetu, hvala što ste mi bile podrška i pomoć, posebno za našeg jednogodišnjeg boravka u Zagrebu.

Hvala mojim prijateljicama u Klubu roditelja „Rastimo zajedno" i Klubu trudnica i roditelja Split za utješne riječi, savjete, podršku, razumijevanje i prijateljstvo.

Hvala mojim prijateljima iz planinarskog društva „Ante Bedalov" Kaštel Kambelovac na nezaboravnim boravcima u prirodi, usponima, pjesmi, smijehu, podršci, što ste bili i jeste moja oaza veselja i odmor od stresa.

- ♦ -

Dragi moj Petre,

hvala ti što si divno i dobro dijete koje je mirno raslo uz mene dok sam izvršavala svoje obaveze na poslu. Hvala za strpljenje i razumijevanje koje je imala tvoja topla i otvorena duša sve ove godine, hvala za igranje legićima dok ja učim, za slaganje autića dok ja pišem seminare, hvala za zabavljanje i igranje sa sekom dok ja pišem i radim. Hvala za dobre ocjene u školi i izvršavanje svojih obaveza. Hvala što si izrastao u empatično, pametno, savjesno i odgovorno dijete i time mi omogućio da se mirno bavim svojim poslom i život mi učinio ljepšim. Hvala za silnu toplinu i ljubav koju mi daje!

Draga moja Mirta,

hvala što si od rođenja bila mirna i dobra bebica, s kojom mi je sve bilo lako, pa čak i učiti za ispite i rješavati obaveze na poslijediplomskom studiju. Hvala za strpljenje i razumijevanje koje je imala tvoja nježna, topla mala duša sve ove godine, hvala za igranje drvenim kockicama dok ja učim, za igru s plišancima dok ja pišem seminare, hvala za zabavljanje i igranje s bracom dok ja pišem i radim. Hvala što si izrasla usnažnu, spretnu, emptičnu i pametnu djevojčicu, koja raste skupa sa mnom i čini moj život ljepšim i smislenijim. Hvala za silnu toplinu i ljubav koju mi daješ!

Dragi moj Dominko,

hvala na podršci, razumijevanju i strpljenju na ovom putu. Zajedno smo izgradili obitelj, dom i tvoju i moju karijeru u isto vrijeme, oboje znamo koliko je to truda i energije tražilo i, evo, uspjeli smo! Hvala za svakodnevna odricanja, ljubav, brigu o djeci, kući i kućanstvu u trenucima moje odsutnosti. Hvala što si uz mene sagradio život koji želim!

Split, 2016.

SAŽETAK ..... **XV**

ABSTRACT ..... **XVII**

§ 1. UVOD **1**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**

2.1. Biljke iz porodice *Asteracea* **4**

2.1.1. Rod Centaurea *4*

2.2. Citogenetika biljaka **11**

2.2.1. Općenito o citogenetici biljaka *12*

2.2.2. Citogenetika roda Centaurea *14*

2.2.3. Citogenetske metode *16*

2.2.3.1. Protočna citometrija 16

2.2.3.2. Kariološke metode 20

2.3. Eterična ulja **21**

2.3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja *24*

2.3.1.1. Terpeni: biokemijski putevi nastanka i klasifikacija 24

2.3.1.1.1. Monoterpeni 32

2.3.1.1.2. Seskviterpeni 34

2.3.1.2. Fenilpropanski spojevi 36

2.3.1.3. Ostali spojevi 37

2.3.2. Kemijski sastav eteričnih ulja vrsta roda Centaurea *38*

2.3.3. Kemotaksonomija *41*

2.3.4. Biološka aktivnost eteričnih ulja *43*

2.3.4.1. Antioksidacijski učinak eteričnih ulja 44

2.3.4.2. Inhibicija enzima kolinesteraza eteričnim uljima 46

2.3.4.3. Antimikrobni učinak eteričnih ulja 51

2.3.5. Metode izolacije eteričnih ulja *52*

2.3.5.1. Destilacija vodenom parom 53

2.3.6. Metode određivanja kemijskog sastava eteričnih ulja *54*

2.3.6.1. Kromatografija 54

2.3.6.2. Spektrometrija masa 57

2.3.6.3. Vezani sustav plinski kromatograf - maseni spektrometar (GC/MS) 59

2.3.6.4. Spektroskopija i spektrofotometrija 59

2.3.7. Metode za određivanje biološke aktivnosti eteričnog ulja *63*

2.3.7.1. Metode određivanja antioksidacijskog potencijala 63

2.3.7.1.1. FRAP-metoda 64

2.3.7.1.2. DPPH-metoda 65

2.3.7.2. Metode određivanja inhibicije kolinesteraza 65

2.3.7.3. Metode određivanja antimikrobnog učinka 66

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **68**

3.1. Kemikalije **68**
3.2. Biljni materijal **69**
3.3. Određivanje veličine genoma biljnog materijala protočnom citometrijom **70**
3.4. Metoda određivanja broja i izgleda kromosoma u jezgri **71**
3.5. Metode izolacije hlapljivih spojeva iz biljnog materijala **72**
3.6. Metode analize hlapljivih spojeva iz eteričnih ulja vezanim sustavom plinska kromatografija - masena spektrometrija (GC/MS) **73**
3.7. Metode određivanja biološkog potencijala hlapljivih spojeva **74**
3.7.1. Metode određivanja antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja *74*
3.7.2. Metoda određivanja sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraze *77*
3.7.3. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja *78*
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **81**
4.1. Citogenetski profil biljaka roda *Centaurea* **81**
4.2. Fitokemijski profil biljaka roda *Centaurea* **89**
Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnih ulja biljaka roda Centaurea *89*
4.3. Biološki potencijal hlapljivih spojeva biljaka roda *Centaurea* **119**
4.3.1. Antioksidacijski potencijal hlapljivih spojeva biljaka roda Centaurea *119*
4.3.2. Sposobnost inhibicije enzima kolinesteraza hlapljivim spojevima iz biljaka roda Centaurea *122*
4.3.3. Antimikrobni učinak hlapljivih spojeva biljaka roda Centaurea *129*
§ 5. ZAKLJUČAK **141**
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA **144**
§ 7. LITERATURNI IZVORI **147**
§ 8. ŽIVOTOPIS ..... **XIX**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

FITOKEMIJSKI I CITOGENETSKI PROFIL ODABRANIH BILJAKA RODA *CENTAUREA* (*ASTERACEAE*)

Ivana Carev
Kemijsko-tehnološki fakultet
Ruđera Boškovića 35
21 000 Split

Rod *Centaurea*, porodica Asteracea, taksonomski je vrlo složen, a 80 od ukupno 400 do 700 vrsta nalazimo na području Republike Hrvatske. Cilj ovoga doktorskog rada bio je odrediti fitokemijski i citogenetski profil odabranih vrsta roda *Centaurea: Centaurea ragusina, Centaurea rupestris* i *Centaurea solstitialis*. Fitokemijski profil, određen kroz kemijski sastav izoliranih hlapljivih ulja, istražen je vezanim sustavom plinska kromatografija - masena spektrometrija. Citogenetski profil, određen kao veličina genoma i osnovni broj kromosoma istraživanih vrsta, istraživan je protočnom citometrijom i standardnim kariološkim metodama. Citogenetski profil fitokemijski proučavanih vrsta u skladu je s prethodnim istraživanjima, čime je utvrđena autentičnost istraživanih vrsta bez dvojbe prilikom botaničke determinacije. Dominantne su komponente hlapljivih ulja odabranih vrsta roda *Centaurea* neoksidirani i oksidirani seskviterpenski spojevi te neterpenske kiseline i ugljikovodici. Germakren D, *β*-kariofilen i heksadekanska kiselina identificirani su u svim proučavanim eteričnim uljima. Izolirana hlapljiva ulja pokazuju slab antioksidacijski potencijal i slabu sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze kao i značajan antimikrobni potencijal.

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: biološka aktivnost / *Centaurea* / eterično ulje / fitokemija / GC-MS / protočna citometrija / veličina genoma/

Mentor: izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo

Rad prihvaćen: na 9. redovitoj sjednici Vijeća kemijskog odsjeka od 1. lipnja 2016. godine.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, PMF, Zagreb
2. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo, KTF, Split
3. dr. sc. Zrinka Kovarik, zn. savj., IMI, Zagreb

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

PYTOCHEMICAL AND CYTOGENETIC PROFILE OF SELECTED *CENTAUREA* SPECIES (*ASTERACEAE*)

Ivana Carev
Faculty of Chemistry and Engineering
Ruđera Boškovića 35
21 000 Split

The *Centaurea* genus, *Asteraceae* family, taxonomically is very complex. It contains 80 species from Croatia, of about 400 up to 700 in total. The aim of this doctoral thesis was to determine the phytochemical and cytogenetic profiles of selected *Centaurea* species: *Centaurea ragusina*, *Centaurea rupestris* and *Centaurea solstitialis*. Phytochemical profile, determined as chemical composition of isolated volatile oil, was assesed with associated gas chromatography-mass spectrometry. Cytogenetic profile, expressed as genome size and chromosome number, was assessed by flow cytometry and standard karyological methods. Cytogenetic profile of species selected for phytochemical research, is in accordance with previous research, which aproves authenticity of the studied taxa. Dominant components of volatile oils of *Centaurea* species are oxidized and nonoxidized sesquiterpenes, and nonterpene acids and hydrocarbons. Germacrene D, *β*-caryophyllene and hexadecanoic acid are identified in all *Centaurea* volatile oils. Isolated volatile oil showed weak antioxidant potential and inhibiton of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, as well as significant antimicrobial potential.

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: biological activity/ *Centaurea*/ essential oil / flow cytometry / GC-MS / genome size / phytochemistry/

Supervisor: Dr. Olivera Politeo, Associate Professor

Thesis accepted: June, 1st 2016.

Reviewers:
Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
Dr. Olivera Politeo, Associate Professor
Dr. Zrinka Kovarik, Senior Advisor

§ 1. UVOD

Zahvaljujući blagoj klimi, povoljnim ekološkim uvjetima i relativno dobroj očuvanosti jadranska obala i otoci vrijedni su izvori brojnih biljnih vrsta čija su se medicinska svojstva koristila stoljećima prije razvoja moderne medicine. Rod *Centaurea* jedan je od najvećih rodova porodice *Asteraceae* te sadrži oko 400 do700 različitih biljnih vrsta rasprostranjenih po cijelom svijetu. Ove vrste najvećim dijelom rastu u mediteranskom području, gdje obitava oko 150 vrsta sistematski botanički raspoređenih u 14 sekcija. U Hrvatskoj postoji oko 80 vrsta ovoga roda, od čega je čak 27 endemskih vrsta.[1-5]

Rod *Centaurea* taksonomski je dosta složen te s obzirom na veličinu predstavlja izvrstan model za istraživanje veličine genoma i njegove evolucije zbog prisutnosti različita osnovnog broja kromosoma i različitih razina ploidije.[1,2]

Neka istraživanja povezuju citogenetska istraživanja biljne vrste i različite razine ploidije sa sastavom eteričnog ulja. Kako bi se rod *Centaurea* taksonomski što preciznije karakterizirao, potrebna su, pored morfoloških, i citogenetska i kemijska istraživanja. Naime sastav eteričnog ulja može pridonijeti i biljnoj taksonomiji temeljenoj na kemizmu biljke. Budući da biljke proizvode svoje sekundarne metabolite ovisno o vlastitoj genetskoj podlozi, za očekivati je da se mogu povezati sastav eteričnih ulja i genetika biljke. Da bi se došlo do specifičnih gena koji su odgovorni za sintezu proteina odgovornih za proizvodnju specifičnih sekundarnih produkata metabolizma, potrebno je utvrditi botaničku i kemijsku klasifikaciju određenih vrsta. Danas je u tu svrhu, pored klasičnih morfoloških i kemijskih karakteristika, neophodno odrediti i veličinu genoma i broj kromosoma ispitivanih vrsta.[6-9]

Eterična ulja sekundarni su biljni metaboliti u čiji sastav ulaze terpenski, fenilpropanski te neterpenski spojevi. Neki od tih spojeva imaju značajan biološki učinak te mogu služiti za određivanje kemotaksonomske raspodjele pojedine biljke. Tako su kod vrsta roda *Centaurea*, koje su do danas ispitane, kao glavne komponente hlapljivih ulja identificirani seskviterpenski spojevi: germakren D, *β*-kariofilen, biciklogermakren, kariofilen-oksid, spatulenol, *α*-kopaen *α*-kadinen, *α*-muurolen, *β*-selinen, *α*-humulen.[8,10-21] Kod nekih pripadnika vrste *Centaurea*

identificiran je velik udio neterpenskih spojeva poput karboksilnih kiselina, posebno heksadekanske kiseline.[15,16,19,20]Od velikog broja vrsta unutar roda *Centaurea*, njih 400 do 700, samo je manji dio kemijski istražen, i to tek 47 vrsta.

Dobro je poznato da su eterična ulja izvor brojnih biološki aktivnih spojeva. Eterična se ulja u etnomedicini koriste u različite svrhe zbog svoga antibakterijskog, antivirusnog, fungicidnog, antiparazitnog i insekticidnog djelovanja, a upotrebljavaju se i u kozmetičke svrhe.[22]

Današnja moderna medicina razvila je brojne sintetske antibiotike na koje su se bakterije tijekom vremena prilagodile i stvorile rezistenciju. U smislu usporavanja ili sprečavanja oksidacijskih procesa kao i u smislu inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), važnog u patogenezi Alzheimerove bolesti, dosad korištena terapija zbog svojih neželjenih učinaka imaju tendenciju zamjene supstancama prirodnog podrijetla. Sve su to razlozi zbog kojih se provodi velik broj istraživanja u smislu proučavanja biološke aktivnosti tvari izoliranih iz prirode, kakva su eterična ulja.[22-24]

Biljne vrste roda *Centaurea*, porodice *Asteraceae* nedovoljno su istražene u kemijskom, citogenetskom i taksonomskom smislu.

U ovom doktorskom radu ispitivan je kemijski sastav eteričnih ulja, veličina genoma (ukupna količina DNA) i osnovni broj kromosoma odabranih vrsta roda *Centaurea*. S obzirom na dobivene rezultate sastava eteričnih ulja, neka od njih testirana su na antioksidacijski i antimikrobni potencijal te sposobnost inhibicije enzima kolinesteraze.

Kemijski sastav eteričnih ulja ispitan je pomoću spregnute tehnike plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC/MS). Veličina genoma ispitana je protočnom citometrijom.[6] Broj i izgled kromosoma određeni su standardnom kariološkom metodom uz pomoć svjetlosnog mikroskopa.

Antioksidacijski potencijal odabranih uzoraka testiran je standardnim metodama DPPH i FRAP.[25-31] Inhibicija acetilkolinesteraze ispitana je metodom po Ellmanu.[32]

Antimikrobno djelovanje ispitano je korištenjem metode disk-difuzije i metode dilucije na uobičajen spektar mikroorganizama iz reda bakterija i gljivica.[33-36]

Cilj ovoga doktorskog rada jest:

- odrediti veličinu genoma i osnovni broj kromosoma u jezgri kod odabranih biljnih vrsta porodice *Asteraceae*, roda *Centaurea*, korištenjem protočne citometrije i standardnih karioloških metoda
- odrediti kemijski sastav hlapljivih spojeva odabranih biljnih vrsta, rod *Centaurea*, korištenjem vezanog sustava plinski kromatograf - maseni spektrometar
- odrediti biološku aktivnost hlapljivih spojeva odabranih biljnih vrsta roda *Centaurea* u smislu antioksidacije, sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraze i antimikrobne aktivnosti.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biljke iz porodice *Asteracea*

Porodica *Asteraceae* (*Compositae*) ili glavočike obuhvaća oko 25.000 vrsta raspoređenih u oko 1 500 rodova. Najveća je porodica na svijetu kako europske tako i hrvatske flore te obuhvaća 8% ukupnih vrsta cvjetnica. U Hrvatskoj se u sastavu ove porodica nalazi 120 rodova sa 753 vrste, uključujući i 183 podvrste.[5]

Porodica *Asteraceae* vrlo je raznolika, većinom obuhvaća zeljaste biljke trajnice (rjeđe jednogodišnje i dvogodišnje), rijetko drvenaste biljke, polugrmove ili lijane. Listovi su im izmjenični, ponekad nasuprotni, bez palistića. Cvjetovi su većinom hermafroditni, višesimetrični ili jednosimetrični, grupirani u obliku cvatova – glavica koje su obavijene ovojem ljuskavih brakteja (involukrum). Ispod pojedinog cvijeta ponekad se nalaze ljuskave brakteje, čaška je ili potpuno zakržljala ili razvijena kao dlačice, ljuščice, čekinjice ili malen kožičast rub. Vjenčić može biti višesimetričan (radijalne simetrije), cjevast na rubu s 4–5 zubaca ili jednosimetričan (bilateralne simetrije) s kratkom cijevi, a rub mu je produljen u duguljast jezičac.[37]

U glavočika cjevnjača, poput roda *Centaurea*, u glavici dolaze cjevasti i jezičasti cvjetovi, a u glavočika jezičnjača, potpor. *Cichoriaceae*, u glavici dolaze samo jezičasti cvjetovi (Nikolić 2013). Haplostemon je građen od 5 prašnika priraslih na cijev vjenčića, antere su srasle u prašničku cijev koja okružuje vrat tučka, što je u izravnoj vezi s načinom oprašivanja. Plodnica je podrasla, jednogradna s 1 sjemenim zametkom. Plod je roška, koja često nosi krunicu, a papus ponekad ima kljun.[37]

2.1.1. Rod Centaurea

Rod *Centaurea* jedan je od najvećih i najsloženijih rodova porodice *Asteraceae*. Broj se vrsta koje obuhvaća tijekom vremena mijenjao i prema današnjim saznanjima obuhvaća oko 400–700 vrsta. Centar distribucije ovoga roda nalazi se na Mediteranu, dok su neke vrste

rasprostranjene na planinama Euroazije koje imaju blagu klimom. Neke vrste koriste se u hortikulturi, pa su široko rasprostranjene, a neke poput *Centaurea solstitialis* invazivne su vrste i nalaze se i u Sjevernoj Americi.[38-41]

Središte razvitka ovog roda je u Europi, istočnomediteranskoj regiji, jugozapadnoj Aziji i Kavkazu, a u hrvatskoj flori nalazi se više od 80 predstavnika toga roda s vrlo varijabilnim vrstama, koje se međusobno i križaju.[3,39,40,42]

Rod *Centaurea* prema trenutno važećoj botaničkoj sistematici dijelimo na tri podroda: *Centaurea*, *Cyanus* i *Lopholoma*, a ova podjela se temelji na istraživanjima DNA sekvenci, kariologije, tipova peludnih zrnaca i morfologije u **tablici 2.1**.[38,43,44]

Tablica 2.1. Klasifikacija roda *Centaurea* iz cirkummediteranske i eurosibirske regije

Rod *Centaurea*
Podrod *Cyanus*[45]
Sekcija *Cyanus*
Sekcija *Perennes*
Podrod *Lopholoma*[46]
Sekcija *Acrocentron*
Sekcija *Stephanochilus*
Podrod *Centaurea* (corresponds to the *Jacea* group)[42]
Istočnomediteranska regija (EMC)
Zapadnomediteranska regija (WMC)
Cirkummediteranska i eurosibirska regija (CMC)
Centaurea benedicta
Jacea-Phrygia group (prethodno *Jacea-Lepteranthus* grupa)
Sekcija *Jacea*
Sekcija *Phrygia* (prethodno sekcija *Lepteranthus*)
Centaurea grupa (prethodno *Acrolophus* podgrupa)
Sekcija *Centaurea* (prethodno sekcija *Acrolophus*)
Sekcija *Phalolepis*
Sekcija *Willkommia*

Vrste roda *Centaurea* višegodišnje su, dvogodišnje, rijetko jednogodišnje biljke. Imaju mnogobrojne sitne glavice na vrhovima stabljika, koje su bogato razgranjene. Invokulum je cilindričan ili okruglast. Jedna od važnijih odlika u morfološkoj determinaciji ovojni su listovi, brakteje koje mogu biti okruglaste, membranaste, cjelovite ili nepravilno rascijepane,

trokutaste i pravilno trepavičaste s vršnim trnčićem ili duljim trnom. Cvatovi su im ružičasti, ljubičasti ili žuti.[37]

Prema flori Europe, tri proučavane vrste iz roda zečina, *Centaurea*, pripadaju različitim sekcijama u **tablici 2.2**.

Tablica 2.2. Pripadnost zečina različitim sekcijama u okviru roda *Centaurea*

Vrsta	Sekcija	opis sekcije
Centaurea rupestris L.	HYALEOLOMA Dostál	biljke s involukralnim listovima glavice okruglastim jajolikim do jajoliko duguljastim, bez trnova, s privjescima hijaline
Centaurea ragusina L.	CARDUIFORMES (Tzvelev) Dostál	involukralni listovi glavice jajoliki do okruglasti, brakteje okruglaste, privjesci češljasto-resasti, uvijek s vršnim trnom najmanje dužine od 3 mm, žuti, smeđi ili crni, na marginama usko- i kratkosilazni.
Centaurea solstitialis L	DUMULOSAE (Hayek) Dostál	mali grmovi, grane i dijelovi lista trnoviti. Involukralni listovi cilindrični, privjesci šiljasti ili trnoviti na vrhu. Cvjetovi roza, bijeli ili kremasti.

Rod *Centaurea* taksonomski je vrlo složen s obzirom na broj vrsta koje obuhvaća i njihovu geografsku rasprostranjenost. Morfološke varijacije posebno su izražene kod ovog roda i rezultat su razlika u kromosomskom broju i postojanju poliploidije te prilagodbi ekološkim uvjetima u kojima vrste obitavaju.[2,47,48]

Većina dosad istraženih vrsta ovog roda u Republici Hrvatskoj raspoređena je sistematski s obzirom na morfološke razlike poput izgleda biljke, oblika listova, šiljaka, ahenija i slično. Morfološke razlike između pojedinih vrsta mogu biti minimalne i navesti na pogrešnu determinaciju, pa je stoga potrebno koristiti i druge pristupe u biljnoj sistematici, kao što su citogenetski i palinološki, kako bismo sa sigurnošću determinirali pojedinu vrstu.[49, 50]

Svako istraživanje organizacije veličine genoma, broja kromosoma i količine DNA u jezgri predstavlja važan alat u botaničkoj sistematici i pridonosi boljoj definiciji ovoga roda i pripadajućih vrsta.[37,42,51]

Najnoviji pristupi u botaničkoj sistematici osim veličine genoma uključuju i detaljniju karakterizaciju kromosoma, vizualizaciju specifičnih DNA sekvenci na kromosomima s regijama bogatim parovima baza G-C ili A-T i rDNA.[1,2,51-57]

Potrebna su istraživanja različitih aspekata ovoga roda kako bismo dobili što precizniju i jasniju podjelu među vrstama. Podaci o morfologiji moraju se nadopuniti podacima o fitokemiji, broju i obliku kromosoma, veličini genoma, tipu polenovih zrna kako bismo postigli što precizniju definiciju pojedinih vrsta.[1,8,49]

Kemotaksonomija također može imati velik značaj u klasifikaciji vrsta roda *Centaurea*, a sastav eteričnog ulja ovih vrsta može dati korisne informacije o njihovoj fitokemiji. Multivarijabilna statistička analiza, koja kombinira rezultate analiza plinske kromatografije - masene spektrometrije eteričnih ulja, može biti jako korisna u kemotaksonomiji toga velikog roda.[8,19,43]

Centaurea ragusina L.

Centaurea ragusina L., dubrovačka zečina, (**slika 2.1)** poznata je u hortikulturi diljem Europe, no njezina prirodna staništa obuhvaćaju srednjodalmatinske otoke, gdje su njezine populacije dobro zastupljene. Ona je ilirsko-jadranski endem, a Zakonom o zaštiti prirode zaštićena je na svim prirodnim nalazištima od 1969 g. Pripada skupini strogo zaštićenih biljaka definiranih prema „Pravilniku o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim“ (NN 99/09).[3,58,59]

C. ragusina biljka je koja raste na potpuno osvijetljenim mjestima, s minimalnim temperaturama između 7 ^{o}C i 9 ^{o}C, težište je na submediteranskim staništima sa slabo bazičnim ili slabo kiselim tlom te ne podnosi zaslanjenje. Pripada biljkama životnog oblika *hemikriptofit*; to su biljke s pupovima neposredno iznad tla, koje preživljavaju zaštićene tkivom.[3,59]

Slika 2.1. *Centaurea ragusina* L., dubrovačka zečina (Autor: doc.dr.sc.Mirko Ruščić)

Dubrovačku zečinu teško je zamijeniti za bilo koju drugu vrstu zečine jer ima specifičnu gustu sniježnobijelu, pustenastu rozetu listova, iz koje izlaze dugačke uspravne stabljike, koje pri vrhu nose 1–3 sumporastožute glavice cvjetova. Listovi su perasto razdijeljeni na odsječke, koji opet mogu biti razdijeljeni. Ovojne ljuske oko cvata jajolike su, blijedozelene pri vrhu s trokutastim češljasto trepavičastim privjeskom, koji završava trnom savijenim unatrag. Cvate od svibnja do srpnja, plod joj je sivkasta valjkasta roška prekrivena poleglim svilenkastim dlačicama. Roška nosi papus srednje dužine sastavljen od bijelih stršećih dlaka. Rasprostranjuje se sjemenom i rijetko ima tendenciju širenja populacije na druga staništa.[3,61,62]

Stenoendemična je vrsta rasprostranjena od sjeverne do južne Dalmacije, poznato je nalazište pored Dubrovnika, odakle joj potječe ime, nalazimo je još i na obalnom dijelu Jadrana te u okolici Cavtata i Splita, kao i na sljedećim otocima: Vis, Biševo, Brusnik, Svetac, Palagruža, Lastovo, Mljet, Kornati, Dugi otok, Čiovo, Šolta, Brač, Hvar i drugi. Raste u pukotinama

vapnenačkih stijena, posebno strmaca koji se uzdižu iz mora te vulkanskim stijenama otoka Brusnika. Nalazi se u sastavu endemične zajednice *Phagnalo – Centauretum ragusina*.[3,59]

Centaurea rupestris L.

Centaurea rupestris L., kamenjarska zečina (**slika 2.2**) posjeduje stabljiku dužine od 5 do 50 (pa i do 70) cm, koja je jednostavna ili slabo razgranata. Listovi su blago vunenasto-dlakavi, goli, blago hrapavi, jednostruko ili dvostruko perasto razdijeljeni, rijetko cjeloviti ili lirasti; plojka lista širine je do 2 mm, vrhovi plojke su šiljasti. Glavica 12–15 mm u promjeru; brakteje cvata su jajolike, sa smeđim privjescima, često završavaju s vršnim trnom. Cvjetovi su blijedožute do narančaste boje, a vanjski su cvjetovi nešto duži od unutarnjih cvjetova. Roška je dužine oko 4 mm, a papus je od 1/3 do 1/2 dužine roške.[37, 60,61]

Slika 2.2 *Centaurea rupestris*, kamenjarska zečina (Autor: Ivana Carev)

Živi na suhim kamenjarskim travnjacima submediteranskog vegetacijskog područja. *Centaurea rupestris* endemična je biljka koja pripada ilirsko-apeninskom flornom elementu, dok podvrsta *Centaurea rupestris* L. *ssp. ceratophylla* (Ten.) Gugler, istražena na otoku Braču, pripada ilirsko-jadranskim endemičnim biljkama.[59]

Zakonom o zaštiti prirode zaštićena je vrsta i prema „Pravilniku o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim“ (NN 99/09) kamenjarska zečina pripada zaštićenim vrstama.[59]

Centaurea solstitialis L.

Centaurea solstitialis L., bodljikava zečina, (**slika 2.3**) za razliku od dviju prethodnih vrste, nije endemična i čak pripada skupini invazivnih vrsta.

Slika 2.3. *Centaurea solstitialis*, bodljikava zečina (Autor: Semir Maslo)

Dvogodišnja je zelena trajnica, stabljika joj naraste od 30 do 100 cm, uspravna je, u gornjem dijelu razgranata, obično sivkasto-pustenasta, grane duge, okriljene. Listovi su suho-kožičasti i dlakavo-paučinasti ili vunenasti ili sivkasto-pustenasti, donji su uvijek lirasto razdijeljeni s trokutasto-duguljastim režnjevima, dok su gornji listovi linearno lancetasti i završavaju trnom. Glavica cvata pojedinačna, involukrum je od 7 do 12 (pa i do 15) mm u promjeru, jajolik, obično okruglasto-jajolik, brakteje su široko-jajolike, s privjescima koji se ne spuštaju, kratki s vršnim trnovima 10–15 (pa i do 30) mm s bazalnim trnom oko 3 mm dužine. Cvjetovi su uvijek žuti, nisu žljezdasti, ujednačeni su. Roške su dužine oko 2,5 mm, crne, s papusima dužine oko 5 mm. Bodljikava zečina zastupljena je s 3 podvrste.[37, 60, 61]

Biljka cvjeta u srpnju i kolovozu i raste u gustim populacijama na suhim osunčanim pašnjacima, kultiviranim područjima i napuštenim staništima. Raste u područjima s umjerenom klimom, na sunčanim i toplim staništima niske nadmorske visine. U ekološkom smislu ova biljka pripada terofitima te pripada južnoeuropskom flornom elementu. Kao autohtona biljka nalazi se u mediteranskom području Europe, ali naseljava i područja Sjedinjenih Američkih Država, gdje je invazivna vrsta.[3,40]

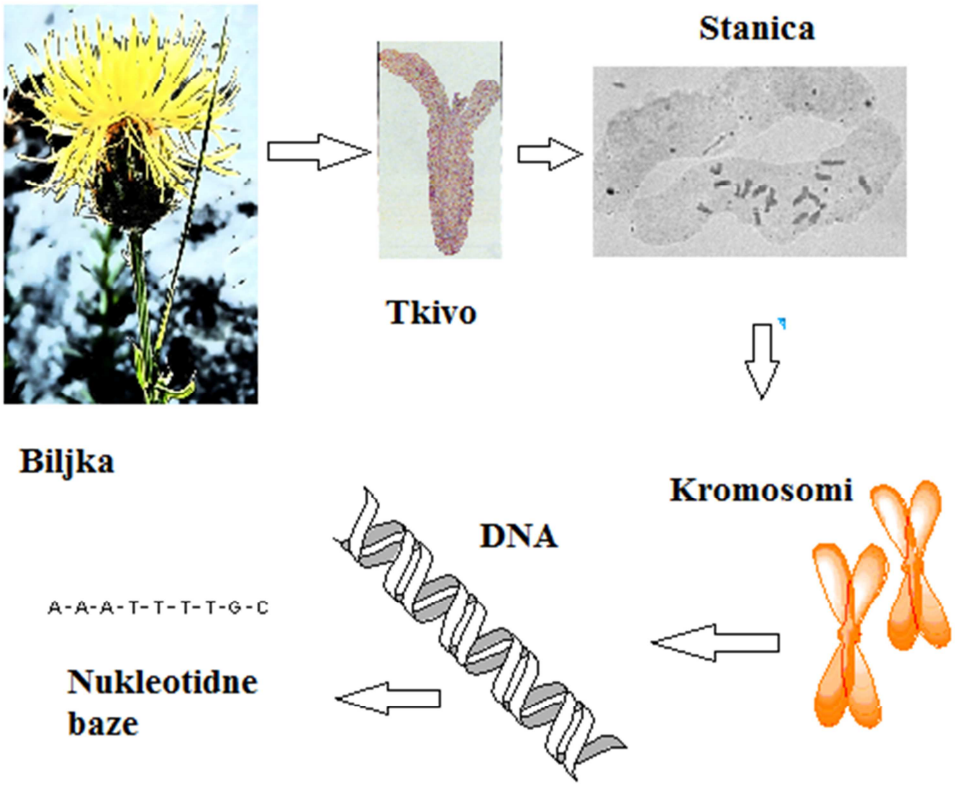
2.2. Citogenetika biljaka

Biljne vrste rastu u populacijama gdje se jedinke međusobno križaju i dalje rasprostranjuju. Kada se neka vrsta nalazi rasprostranjena na velikom geografskom području, dolazi do nastanka populacija koje su geografski udaljene i rastu u drugačijim ekološkim uvjetima. Tijekom vremena postepeno se mijenja zaliha gena i populacije se uslijed ekoloških i evolucijskih čimbenika mogu genetski promijeniti, te mogu nastati novi varijeteti, podvrste i vrste. Ukoliko je došlo do ograničene izmjene gena uslijed nastanka poliploidije ili neke druge biološke barijere, dolazi do nastanka morfoloških razlika među populacijama koje otežavaju botaničku sistematizaciju. U tim slučajevima citogenetika pojedinih vrsta ima ključnu ulogu u preciznoj botaničkoj taksonomiji pojedinih vrsta, a kemotaksonomija može imati značajan doprinos.[62, 63]

2.2.1. Općenito o citogenetici biljaka

Citogenetika biljaka je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem strukture kromosoma, njihova broja i ponašanja tijekom stanične diobe u mitozi i mejozi (**slika 2.4**). U posljednje vrijeme jedan od važnijih aspekata citogenetike odnosi se na proučavanje veličine genoma i njegova sadržaja u parovima baza A-T i G-C.

Citogenetika biljaka naglo se počela razvijati nakon otkrića Mc Clintock, 1931, kojim je uspjela identificirati pojedinačne kromosome u metafaznoj staničnoj jezgri.[56] Od tada do danas citogenetika je značajno napredovala razvojem brojnih tehnika koje omogućavaju proučavanje stanične jezgre i njezina sastava. Klasične metode bojanja nukleinskih kiselina i kromosoma, poput Feulgen-bojanja, bojanja karminom, orceinom i drugih, nedavno su nadopunjene tehnikama molekularne citogenetike poput metode vezanja fluorokroma i *in situ* hibridizacije, kako bi se što detaljnije definirali kromosomi i dijelove DNA na određenim kromosomima. Uvođenjem protočne citometrije u istraživanja te drugih snažnih tehnika za identificiranje dijelova DNA razvoj biljne citogenetike i dalje snažno napreduje.[56,72, 73]



Slika 2.4. Biljka, tkivo, stanica, kromosomi, DNA, nukleotidne baze

Veličina genoma (2C, količina DNA) važna je karakteristika i koristan parametar u vrednovanju bioraznolikosti kao i u evolucijsko-taksonomskim istraživanjima.[64-71] Unatoč biološkoj važnosti veličina genoma određena je tek za 2% ukupnih cvjetnjača.[72]

2C-vrijednost ili veličina genoma, tj. sadržaj DNA u jezgri, važno je obilježje pojedine vrste. Ona odgovara veličini genoma kompletnoga kromosomskog seta bez obzira na razinu ploidije, dok 1C-vrijednost odgovara polovici 2C-vrijednosti i odgovara veličini haploidnog genoma kod diploidnih vrsta. 1Cx-vrijednost označava veličinu baznog genoma koji odgovara baznom broju kromosoma. Tako je kod diploidnih vrsta 1C-vrijednost jednaka 1C-vrijednosti i iznosi polovicu 2C-vrijednosti, dok je kod tetraploidnih vrsta 1Cx vrijednost jedna četvrtini 2C-vrijednosti.[72,74]

Mjerna jedinica za količinu DNA u jezgri izražava se na više načina: kao pikogrami DNA (pg DNA), kao broj baznih parova ili kao relativna vrijednost u odnosu na razinu ploidnosti. Jezgre ljudskih stanica i stanica jegulje koriste se kao interni standardni za definiranje veličine genoma kod životinja i biljaka. Prema Doleželu, može se izračunati relativna masa nukleotidnih parova kao slijedi: A-T = 615,3830 i G-C = 616,3711, imajući na umu da stvaranje fosfodiesterske veze uključuje i gubitak jedne molekule vode. Fosfati u nukleoditima DNA-lanca kiseli su, pa je kod fiziološkog pH jedan H^+ ion disociran. Ako pretpostavimo da omjer A-T : G-C parova iznosi 1:1, te ignoriramo modificirane nukleotide, srednja relativna masa nukleotidnog para iznosi 615,8771. Relativna molekularna masa može biti izražena i u apsolutnoj vrijednosti korištenjem jedinice atomske mase, koja iznosi 1/12 mase ugljikova izotopa C^{12} i iznosi $1{,}660539 \times 10^{-27}$kg.[72]

Iz toga slijedi da je srednja vrijednost mase nukleotidnog para jednaka 1.023×10^{-9}pg i jedinica za količinu od 1 pg DNA predstavlja $0{,}978 \times 10^9$ parova baza. Iz ovoga slijedi da je formula za pretvaranje broja nukleotidnih parova (bp) u pikograme (pg) DNA i obrnuto sljedeća:

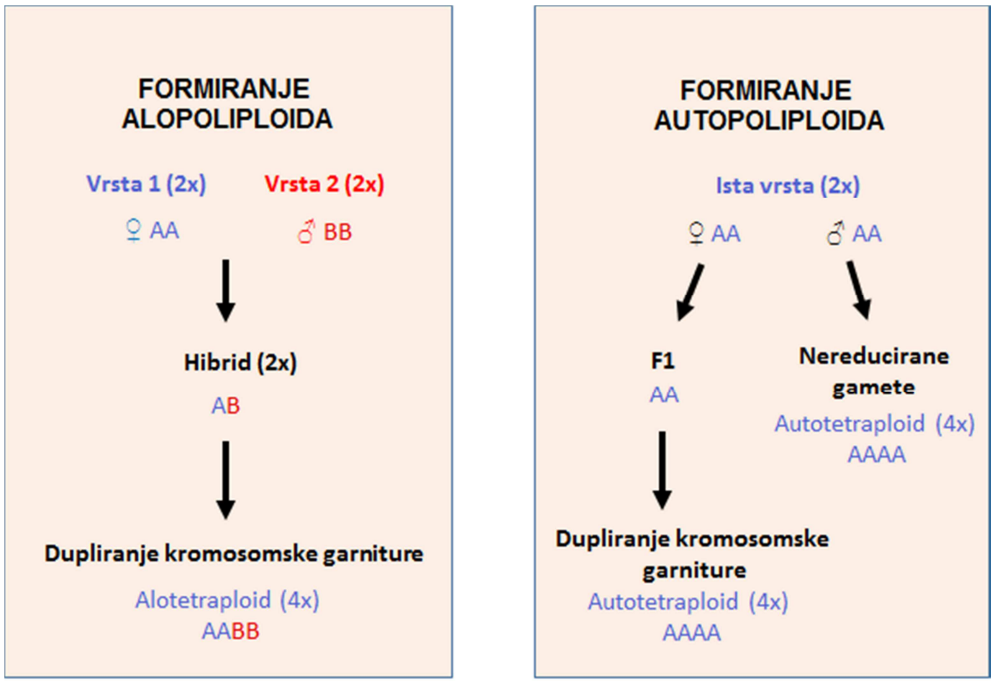
$$\text{veličina genoma (bp)} = (0{,}978 \times 10^9) \times \text{DNA-sadržaj (pg)}$$

$$\text{DNA-sadržaj (pg)} = \text{veličina genoma (bp)}/(0{,}978 \times 10^9).$$

1C-vrijednost je količina DNA koja se nalazi u haploidnoj jezgri nerepliciranog seta kromosoma, izražava se u pikogramima (pg) i megaparovima baza (Mbp). gdje je 1 pg = 978 Mbp. 1Cx vrijednost je monoploidna veličina genoma i izražava se u megaparovima baza. Stanice u stanju mirovanja tako imaju 2C količinu DNA u nerepliciranoj jezgri i ona kod biljaka varira između 0,1pg i 127,4pg.[6,72,74, 85]

2.2.2. Citogenetika roda Centaurea

Rod *Centaurea* najčešće pokazuje dvije razine ploidnosti, diploid (2x) i tetraploid (4x) s osnovnim brojem kromosoma, koji može varirati od x = 7 do x = 16. Međutim rjeđe se mogu pojaviti i heksaploidi, pa i vrste s još većom razinom ploidije.



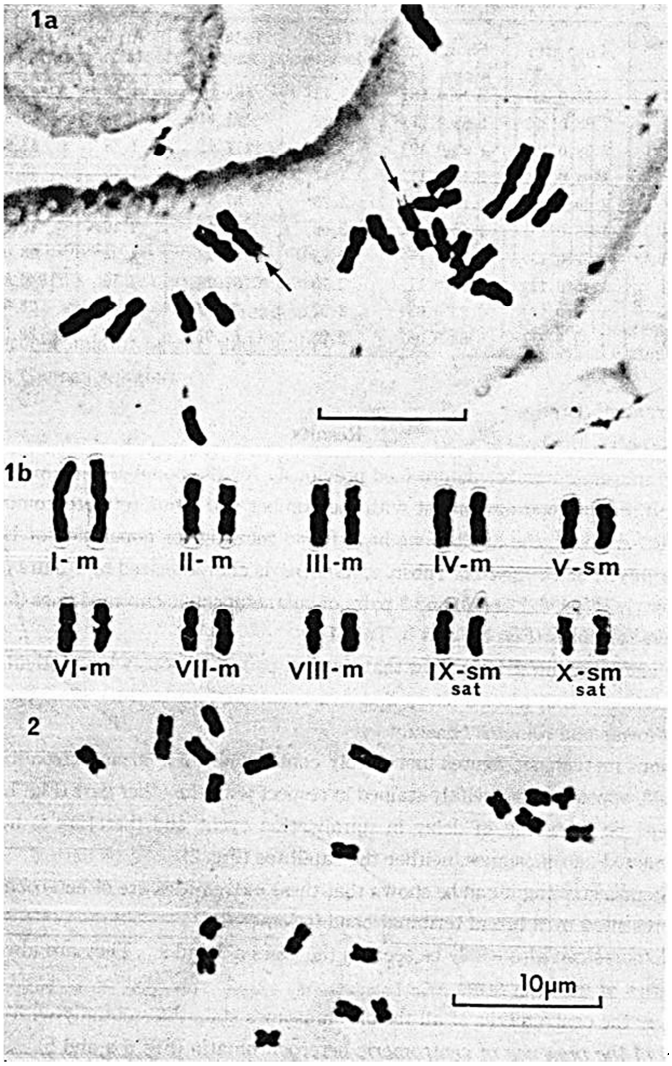
Slika 2.5. Dva načina formiranja poliploida: alopoliploidi i autopoliploidi

Poliploidne vrste mogu biti alopoliploidi ili autopoliploidi. Do formiranja poliploida dolazi nakon hibridizacije između dvaju različitih taksona ili autopoliploidijom, koji nastaju najčešće nakon spajanja dviju nereduciranih gameta ili somatskom duplikacijom kromosomskog broja u stanicama meristemskog tkiva (**slika 2.5**).[55, 68, 76]

Broj kromosoma koji se nalazi u gametama bez replikacije predstavlja haploidni komplement i označava se s „n“. Osnovni broj kromosoma označava se s „x“ i on može, što je slučaj kod

diploida, i ne mora, kao kod poliploida, biti identičan „n“. Organizmi mogu imati različitu razinu ploidnosti i osnovnog broja kromosoma te se s obzirom na to mogu tretirati kao zasebne vrste. Ploidnost se opisuje kao broj kromosomskih komplementa koji može biti različit čak i kod iste vrste, gdje onda govorimo o različitim citotipovima.[6]

Određivanje strukture citotipa pojedine populacije danas je zahvaljujući protočnoj citometriji moguće i brzo te ima izravnu korist u populacijskoj biologiji multiploidnih vrsta. Korisno je također i u biosistematici, istraživanju evolucijskih sila koje omogućavaju postojanje paralelno više citotipova te u istraživanju utjecaja ekoloških uvjeta na određene citotipove.[74]



Slika 2.6. Bojanje metafaznih kromosoma Feulgen bojanjem (1a) i kariogram vrste *Centaurea ragusina* (1b). Snažno kontrahirani kromosomi navedene vrste (2); preuzeto iz [77]

U posljednjih nekoliko godina protočna se citometrija u biljnoj sistematici najčešće koristi za određivanje količine DNA u jezgri, bilo relativnih bilo apsolutnih vrijednosti. Pritom se određuje razina ploidnosti i reproduktivni stadij. To je brza, točna i precizna metoda, koja omogućava detekciju čak i vrlo malih promjena u količini DNA.[55, 64, 71, 74, 78]

Broj i izgled kromosoma određuju se standardnim kariološkim metodama, gdje se kromosomi u stanici bojaju, a mikroskopski preparati proučavaju svjetlosnim mikroskopom (**slika 2.6**).

Detaljna citogenetska istraživanja rađena su na malom broju predstavnika roda *Centaurea*. Iako je porodica *Asteraceae* dosta dobro istražena, veličina genoma poznata je za samo 4,7% vrsta. Tako je primjerice količina DNA poznata samo kod 50 od 400 do 700 priznatih vrsta roda *Centaurea*.[57, 76, 79] Razlike u C-vrijednosti među cvjetnjačama mogu biti i do 2400 puta.[66, 80]

Veličina genoma kod dosad proučavanih *Centaurea* vrsta varira između 2C = 1,64 i 2C=4,30 pg.[1,3,76,81-83] Te vrijednosti svrstavaju ove vrste u kategorije vrlo malih (1C < 1,4) i malih (1,4–3,5) genoma prema klasifikaciji Leitch et al. (1998). Veličine genoma veće od toga povezane su s višom razinom ploidnosti.[76]

2.2.3. Citogenetske metode

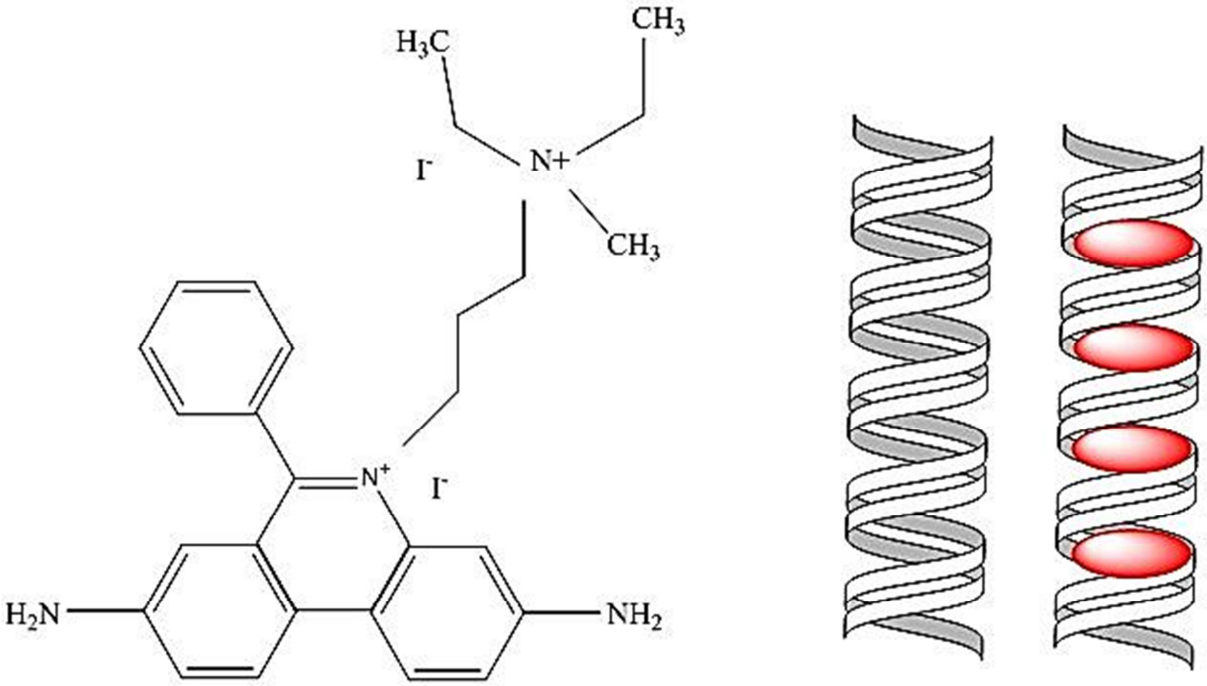
2.2.3.1. ***Protočna citometrija***

Protočna citometrija, jednostavno rečeno, brzo i lako mjeri fizička i kemijska svojstva stanica i njezinih dijelova dok u uskom tekućem mlazu prolaze kroz sustav detekcije. To je vrlo efikasna i snažna tehnika, koja koristi optička svojstva pojedinačnih čestica koje analiziramo, najčešće svojstvo fluorescencije, u svrhu istovremene analize velikog broja pojedinačnih čestica uz pomoć zrake svjetla, najčešće lasera.[84]

Protočna citometrija razvila se 60-ih godina prošlog stoljeća, kada se koristila u biomedicinskim istraživanjima. Zahvaljujući razvoju protočnih citometara, koji se lako i jednostavno koriste i održavaju, te razvoju novih boja ta se tehnika danas često koristi u brojnim biološkim istraživanjima.[74]

Tehnika protočne citometrije upotrebljava u medicini, reproduktivnoj biologiji, evoluciji veličine genoma, botanici, taksonomskoj identifikaciji i delineaciji te studijama poliploidnosti. Koristi se također i za karakterizaciju staničnih linija, strukture i sastava mikrobnih zajednica te je u posljednje vrijeme široko rasprostranjena u različitim biološkim istraživanjima. Nama je zanimljivo korištenje protočne citometrije u svrhu preciznije biljne sistematike, za mjerenje veličine genoma i razine ploidnosti, čiji su podaci od ključnog značaja za biosistematiku i taksonomiju proučavanih biljaka.[84]

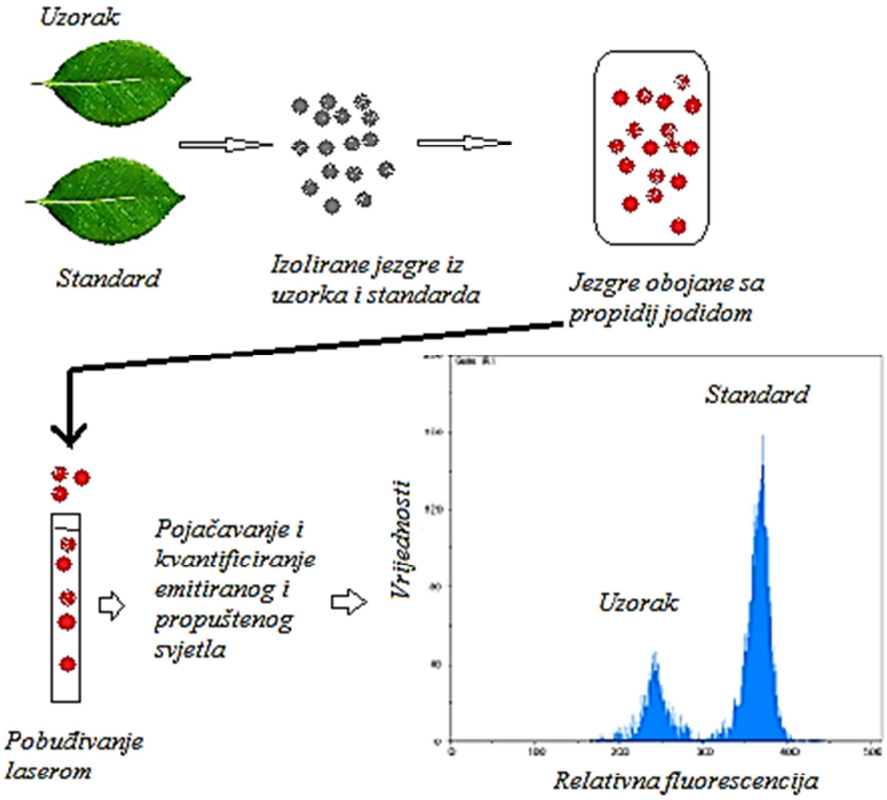
Mjerenjem fluorescencije koju emitira jezgra ili DNA u kombinaciji s odabranom bojom, fluorokromom, omogućava se vrlo precizno određivanje količine DNA i njezina sastava baza u obliku udjela G-C- i A-T baza.[84]



Slika 2.7. Propidijum-jodid strukturna formula i interkalarno vezanje za molekulu DNA

Fluorokrom je kemijski spoj koji fluorescira, tj. ima sposobnost apsorpcije svjetla i emitiranje fluorescencije ili svjetlosti drugačije valne duljine. Postoje tri tipa fluorokroma koja se koriste u protočnoj citometriji: interkalirajući, kao što je propidijum-jodid (PI); A-T-specifični, poput 2-(4-amidinofenil)-1*H*-indol-6-karboksamidin ili, drugim imenom, 4,6 diamino-2-fenilindol (DAPI) te G-C-specifični, poput mitramicina ili kromomicina (**slika 2.7**).

DAPI se selektivno veže za ili na regije DNA bogate bazama A-T, pobuđuje se UV-svjetlom i emitira plavu boju te se često koristi za određivanje razine ploidnosti dajući histograme visoke rezolucije. Propidijum-jodid veže se interkalarno za dvostruku uzvojnicu nukleinske kiseline, DNA, pobuđuje se plavozelenim svjetlom i emitira fluorescenciju u crvenoj boji. Može se vezati i na molekulu RNA, zbog čega je potrebno uzorak prethodno obraditi ribonukleazom. Najčešće se koristi kao fluorokrom u protočnoj citometriji.[74]



Slika 2.8. Shematski prikaz korištenja protočne citometrije u određivanju veličine jezgrinog staničnog genoma

Protočni citometar sastoji se od pet osnovnih jedinica: izvora svjetlosti, komore za protok i fluidnog sistema, optičkog dijela s lećama, filtrima i zrcalima, zatim dijela za procesiranje signala sa fotodetektorima, konverterima i kompjuterskom jedinicom. Izvor svjetla mogu biti laser ili električna lampa. Laser stvara stabilno, usmjereno monokromatsko svjetlo, a valna duljina ovisi o plinu kojim je ispunjena plazma-cijev te ne zahtijeva korištenje filtera. Današnji biljni citometri koriste laserska svjetla s ohlađenim argonom od λ_{488} nm. Živine

električne lampe jeftin su izvor svjetla u protočnom citometru i često se koriste u biljnoj citometriji i određivanju razine ploidnosti. Emitiraju nemonokromatsko svjetlo, pa su potrebni brojni optički filtri da se odabere odgovarajuća valna duljina, najčešće u UV-području.[74] (**slika 2.8**).

Komora za protok predstavlja centralni dio uređaja i cilj joj je osigurati da se proučavane čestice kreću u jednom uskom snopu čestica u tekućini te ih donijeti jednu po jednu do fokalne točke za izvor svjetlosti. To se postiže tzv. hidrodinamičnim fokusiranjem, gdje se uzorak injektira u mlaz tekućine, koja se kreće velikom brzinom i centrira uzorak u središte, nakon čega sve skupa prolazi kroz uzak prolaz u komori. Ubrzanje prisiljava čestice uzorka da se kreću pojedinačno i dođu do mjesta pobuđivanja svjetlom. Tipična brzina iznosi 1–10m/s, što odgovara nekoliko tisuća pojedinačnih analiziranih čestica.[74]

Optička jedinica instrumenta omogućava fokusiranje, izvor je svjetlosti tzv. pobuđenog snopa, omogućava odabir valne duljine, sabiranje izlaznog svjetla i njegovo dostavljanje na detektor. Snop svjetla usmjeren je na fotodetektor, koji pretvara svjetlosni signal u električni impuls, prilikom čega se signal može procesirati i sačuvati u obliku digitalne informacije. Dobiveni se podaci analiziraju i izražavaju na način koji zahtijeva istraživanje, a kod biljaka su to najčešće histogrami s koeficijentima varijabilnosti. Većina citometara koristi i standarde za protočnu citometriju, a podaci se obrađuju i statistički. Najvažniji parametri koje dobijemo su srednji položaj u kanalu, broj procesiranih čestica i koeficijent varijacije.[74]

Određivanje količine DNA u jezgri, u apsolutnim ili relativnim vrijednostima, danas je najčešća primjena protočne citometrije u biljnoj biosistematici. Ovaj pristup omogućava brzo određivanje razine ploidnosti i veličine genoma.[74]

Budući da se u protočnoj citometriji određuje relativni intenzitet fluorescencije, da bi se ispravno interpretirali podaci, potrebno je koristiti standard. Interni standard analizira se u isto vrijeme kao i uzorak, dok se vanjski analizira odvojeno od uzorka. Standard koji se koristi mora imati genom koji je slične veličine kao i onaj koji proučavamo, no ne previše slične kako ne bismo dobili preklapanje histograma. Preporučen omjer veličina ne smije prelaziti dvostruku veličinu genoma u odnosu na standarde prikazane u **tablici 2.3**.[4]

Tablica 2.3. Standardi koji se najčešće koriste u protočnoj citometriji[75]

Naziv vrste	Količina DNA (pg)
Petunia hybrida Vilm. 'PxPC6'	2,85
Raphanus sativus cv Saxas	1,11
Solanum lycopersicum cv Stupcke	1,96
Glycine max	2,5
Zea mays	5,72
Pisum sativum cv Citrad	9,09
Secale cereale	16,19
Vicia faba	26,90
Alium cepa	34,89

Prilikom rada na protočnom citometru vrijednosti za istraživane vrste dobiju se proučavanjem histograma. Histogram je dvodimenzionalni graf koji vizualno prikazuje parametre protočne citometrije, gdje os x opisuje intenzitet registriranog signala, fluorescencije, a os y broj staničnih jezgri koji prolaze u snopu. Vrijednost koja se koristi za opisivanje visine pikova na histogramu izražena u postotcima zove se koeficijent varijacije (CV). Koeficijent varijacije označava standardnu devijaciju od srednje vrijednosti serije fluorescentnih signala i dozvoljava uspoređivanje kvalitete pikova smještenih na različitim fluorescirajućim kanalima. Koeficijent varijacije utječe na rezoluciju parametara protočne citometrije i jako nizak prag tolerancije, od najviše 3%, mora se poštivati ako želimo dobiti pouzdane rezultate.[74]

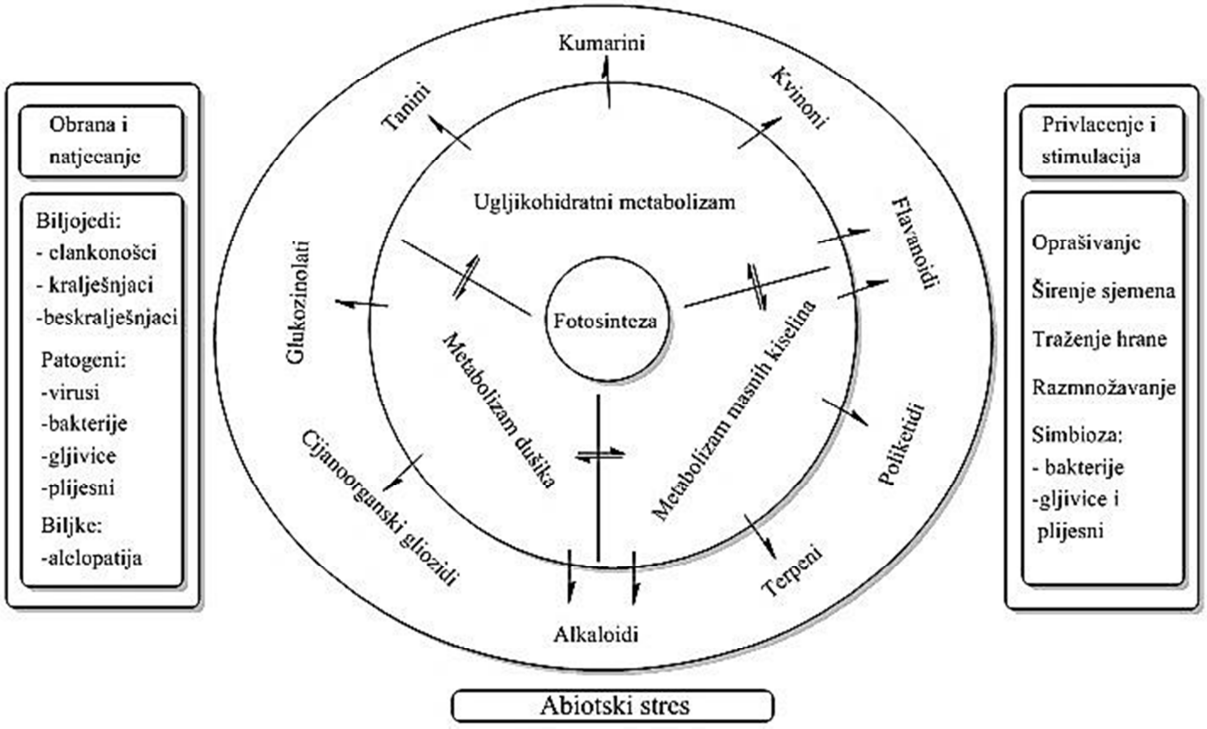
U biljnoj protočnoj citometriji najčešće se koristi svježe biljno tkivo, budući da su sušenje i dehidracija tkiva povezane sa smanjenom kvalitetom uzorka i analizama protočne citometrije loše kvalitete.[73, 86]

2.2.3.2. ***Kariološke metode***

Za određivanje broja kromosoma koriste se standardne kariološke metode s klasičnim bojilima (karmin, orcein, Shiff) i proučavanje kromosoma u jezgri putem svjetlosnog mikroskopa.

2.3. Eterična ulja

Eterična ulja, prema Farmakopeji, smjese su spojeva, sekundarnih metabolita, hlapljivih svojstava koje uglavnom sadrže hlapljive komponente. Eterično ulje uglavnom nastaje u višim biljkama. Prema nekim procjenama postoji više od 17.500 aromatičnih biljnih vrsta, smještenih najčešće u porodice *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Pinaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Umbeliferae* i mnoge druge[87].



Slika 2.9. Funkcija sekundarnih metabolita u biljkama; preuzeto i prilagođeno iz [88]

Eterična ulja nastaju u biljnoj citoplazmi kao produkt metabolizma, odnosno kao sekundarni metaboliti, te se izlučuju u specifičnim uljnim stanicama ili šupljinama smještenim u biljnim organima. Dugo se smatralo da su eterična ulja otpadni produkti, no danas znamo da imaju značajnu ulogu u zaštiti biljnog organizma od nepovoljnih životnih uvjeta poput nedostatka hrane, isušivanja, nepovoljnih oskudnih ekoloških uvjeta poput suše i mnogih drugih. Osim navedenog eterična ulja služe i u obrani biljaka od predatorskih životinja i privlačenju kukaca u svrhu oprašivanja kako je prikazano na **slici 2.9**.[88]

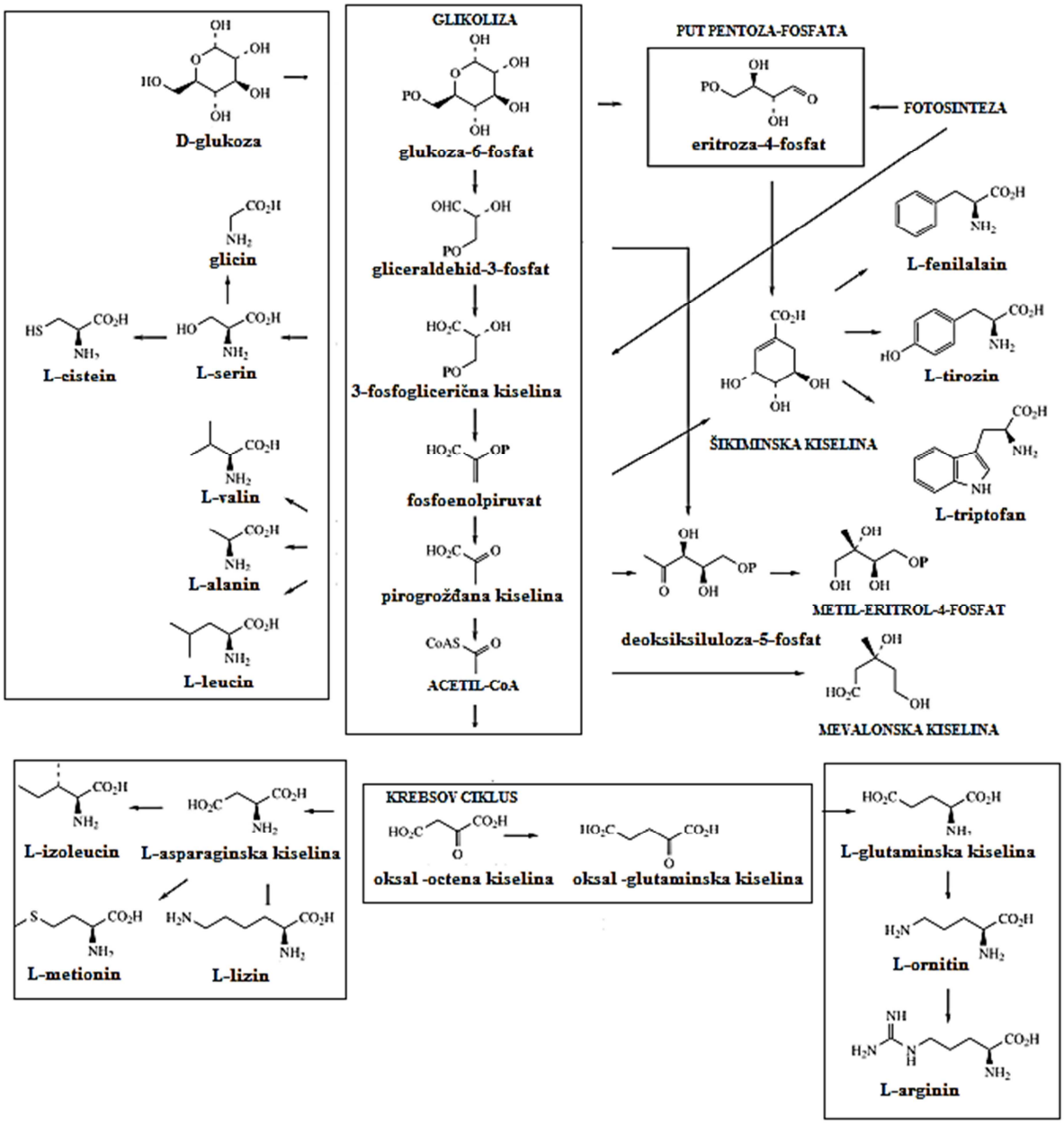
Eterična ulja predstavljaju smjese biljnih sekundarnih metabolita i poznato je da još od davnina imaju brojne primjene korisne za čovjeka. Eterična su ulja tekući preparati dobiveni

iz biljnih dijelova poput cvijeta, lista, sjemenki, stabljike, kore, drva, korijena i plodova. Nazivaju se još i hlapljivim i esencijalnim uljima, najčešće su rjeđa od vode, a rijetko se nalaze u krutom obliku. Boja im varira od blago žute do smaragdnozelene ili plave te jako smeđe.[89]

Poznato je da su eterična ulja korištena kao lijekovi još od davnih vremena i mnoge ih kulture u svojim etnomedicinama koriste kao medicinske preparate. U današnje vrijeme eterična ulja prepoznata su i značajna u znanstvenim istraživanjima, prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Eterična ulja bila su među prvim biljnim produktima koji su proučavani u kemiji zbog svoga aromatičnog mirisa. Zbog velikog broja različitih spojeva koji mogu imati značajnu biološku aktivnost, eterična su ulja značajna u istraživanjima organske kemije, biokemije i farmakologije.[89, 90]

Biljke proizvode sekundarne metabolite, prirodne kemijske spojeve čija je biosinteza specifična za određene biljne skupine. Sekundarni metaboliti imaju brojne značajne uloge u biljnom organizmu, a mogu biti korisni i za čovjeka. Danas se brojni biljni sekundarni metaboliti koriste u medicini kao i u prehrambenoj industriji.[7, 22, 91]

Sekundarni metaboliti nastaju iz intermedijera, koji su dio primarnog metabolizma. Primarni metaboliti iz osnovnih metaboličkih reakcija poput fotosinteze, glikolize i Krebsovog ciklusa služe kao gradivni elementi za sekundarne metabolite. Iako su primarni i sekundarni metabolički procesi složeni, osnovnih zajedničkih intermedijera, koji ulaze u složene metaboličke puteve primarnog i sekundarnog metabolizma zapravo ima samo nekoliko. Najznačajnije gradivne molekule koje ulaze u biosintezu sekundarnih metabolita šikimatskog puta, puta mevalonske kiseline, acetatnog puta ili metil-eritrolnog puta nastaju iz zajedničkog intermedijera acetil-koenzima A (acetil-CoA). Posebno je značajno kombiniranje intermedijera iz osnovnih metaboličkih puteva, što rezultira velikim brojem različitih sekundarnih metabolita, kako je prikazano na **slici 2.10**.[92, 93]



Slika 2.10. Metabolički putevi primarnog metabolizma izvor su strukturnih intermedijera sekundarnog metabolizma. Reakcije i intermedijeri primarnog metabolizma su uokvireni.[93]

2.3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Eterična ulja u svom sastavu sadrže mnoštvo različitih kemijskih spojeva. Klase hlapljivih spojeva koje se nalaze u sastavu eteričnih ulja možemo svrstati u tri grupe spojeva: terpene, fenolne derivate i druge spojeve. U sastav eteričnih ulja ulaze i spojevi koji sadrže sumpor ili dušik i mnoge druge.[22, 23, 90]

Sastav eteričnog ulja može se razlikovati između pojedine vrste ili podvrste, kao i kod iste vrste s različitog lokaliteta zbog utjecaja ekoloških uvjeta.[7, 22, 23]

Eterična ulja sastoje se od lako hlapljivih komponenti, koje svrstavamo u skupine kako slijedi:

- terpeni
  - monoterpeni, alifatski i ciklički, oksidirani i neoksidirani
  - seskviterpeni, alifatski i ciklički, oksidirani i neoksidirani
  - diterpeni, alifatski i ciklički, oksidirani i neoksidirani
- fenilpropanski spojevi
- ostali spojevi
  - neoksidirani ugljikovodici, alifatski i ciklički
  - oksidirani ugljikovodici
    - alkoholi, aldehidi, ketoni, eteri, esteri i karboksilne kiseline

2.3.1.1. ***Terpeni: biokemijski putevi nastanka i klasifikacija***

Terpeni su skupina organskih spojeva jako rasprostranjenih u prirodi. Možemo ih naći u brojnim biljnim vrstama, kod algi, lišajeva, nekih insekata i mikroorganizama, a ako im pribrojmo i skupinu steroida, onda ih nalazimo i kod životinja. Neki od ovih terpenskih spojeva koriste se od davnina kao mirisi, lijekovi i bojila.[94]

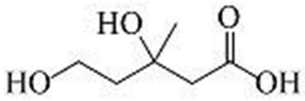
Osnovna građevna jedinica terpena je spoj izopren. Izopren je otkriven kao otpadni produkt brojnih cikličkih spojeva, zbog čega je predložen kao osnovna građevna jedinica tih složenih spojeva, međutim sam izopren nije uključen u sintezu navedenih skupina spojeva (**slika 2.11**).
93-95

izopren izoprenska jedinica

Slika 2.11. Izopren i izoprenska jedinica

Biološki aktivan oblik izoprena, koji je stvarni prekursor u metabolizmu terpena, struktrurno je sličan 3-izopentenil-pirofosfat (IPP).

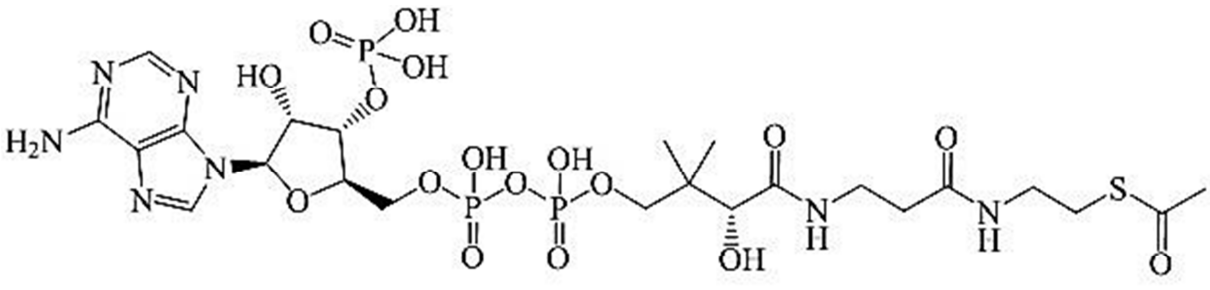
Metabolički put nastanka terpena nazivamo mevalonski put budući da je mevalonska kiselina (MVA) prekursor u stvaranju terpena (**slika 2.12**).



Slika 2.12. Mevalonska kiselina

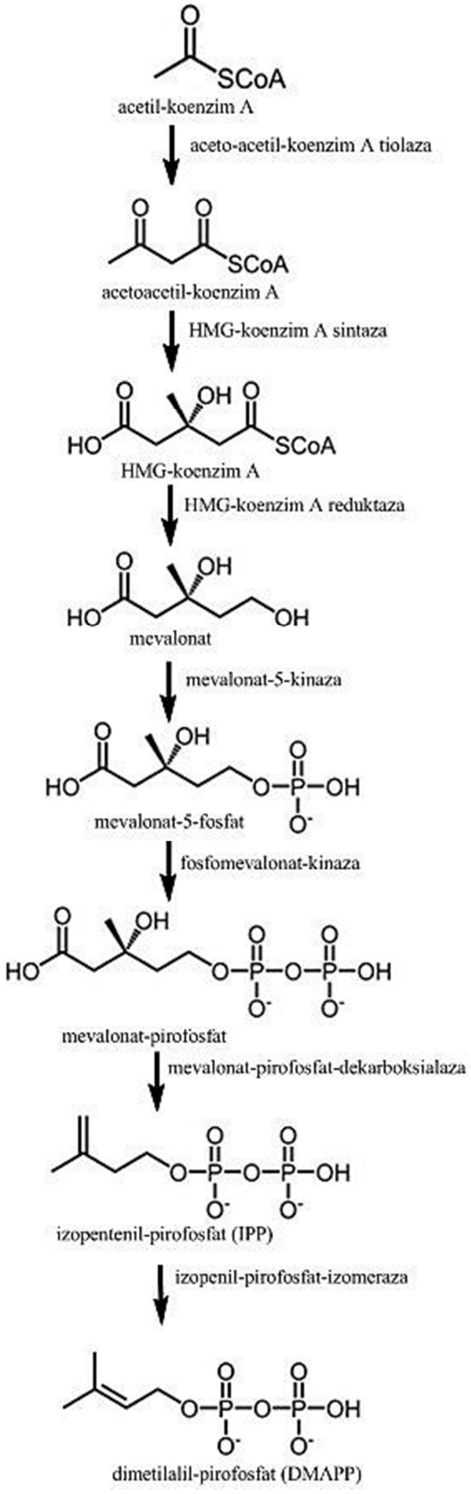
Budući da se u eteričnim uljima vrsta roda *Centaurea* monoterpeni nalaze tek u tragovima, a u velikom udjelu nalaze se seskviterpeni, opisat ćemo detaljnije mevalonski metabolički put u kojem nastaju seskviterpeni. Seskviterpeni (C_{15}) su spojevi sa 15 ugljikovih atoma, sastavljeni su od 3 izoprenske jedinice.

Preteče mevalonske kiseline dolaze iz acetatnog puta, no acetil-CoA u putu mevalonske kiseline odlazi u drugačije serije reakcija nego u acetatnom putu. Biološki prekursor u sintezi terpena u primarnom metabolizmu je acetil-koenzim A (acetil-CoA) (**slika 2.13**).



Slika 2.13. Acetil-koenzim A, prekursor u mevalonskom putu

Tri molekule acetil-CoA potrebne su za formiranje mevalonske kiseline. Mevalonska kiselina, koja ima šest ugljikovih atoma, pretvara se u izoprensku jedinicu od pet ugljikovih atoma brojnim složenim biokemijskim reakcijama uz pomoć enzima prikazani na **slici 2.14.**[93]



Slika 2.14. Mevalonski metabolički put, preuzeto i prilagođeno iz [92]

Biološki aktivni oblici izoprenske jedinice su dimetilalil-pirofosfat i 3-izopentenil- pirofosfat (**slika 2.15**).[93-95]

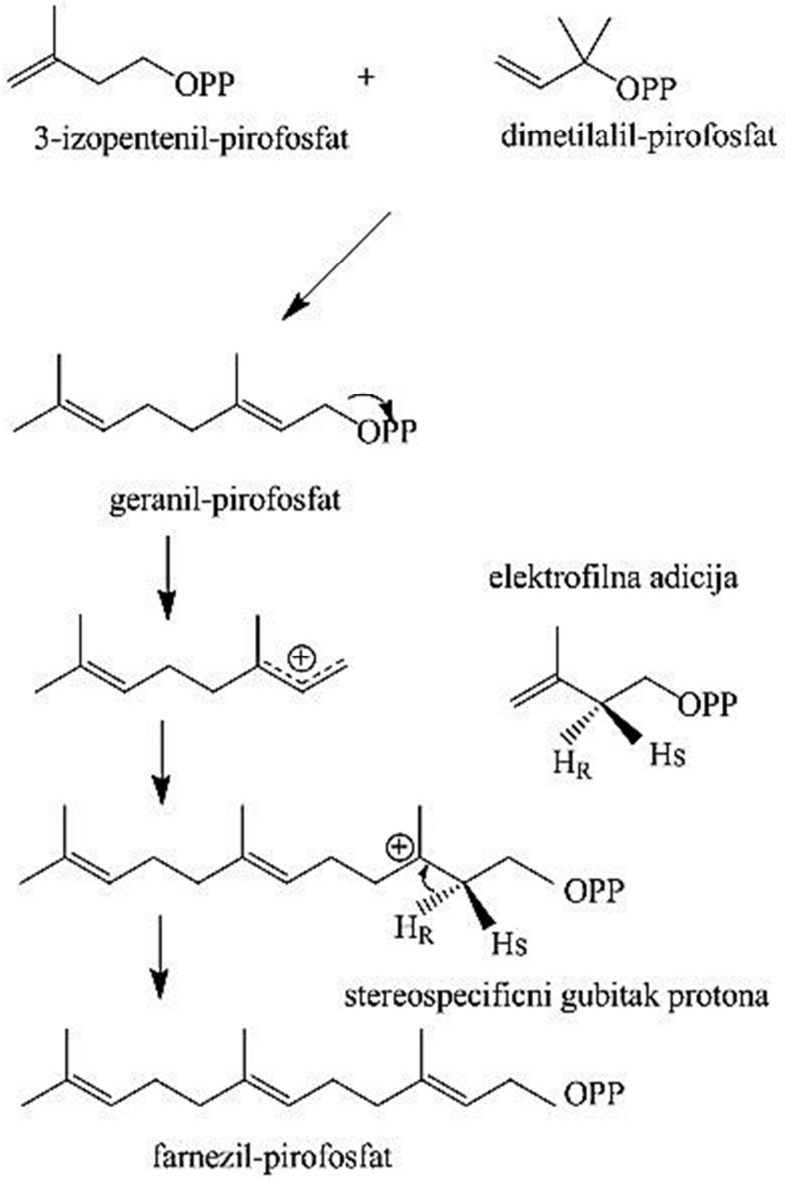
dimetilalil pirofosfat izopentenil pirofosfat

Slika 2.15. Biološki aktivni oblici izoprena: dimetilalil pirofosfat i izopentenil pirofosfat

Najjednostavnija jedinica, izopentenil-pirofosfat (IPP), nastaje fosforilacijom primarne alkoholne skupine uz pomoć dva ATP-ovisna enzima, pri čemu dolazi do nastanka pirofosfata mevalonske kiseline, nakon čega slijede dekarboksilacija i dehidracija. Izopentenil-pirofosfat se dalje izomerizira uz pomoć enzima izomeraze u dimetilalil-pirofosfat (DMAPP). Ova reakcija je reverzibilna i ravnoteža joj je snažno pomaknuta na stranu DMAPP. Dva izomera, IPP i DMAPP, pokazuju razlike u reaktivnosti gdje je IPP nukleofil, a DMAPP elektrofil. Sudjeluju u reakcijema koje generiraju nastajanje snažnih elektrofila i dobrih alkilnih agensa i princip su po kojem nastaju svi oblici terpenskih molekula.[93]

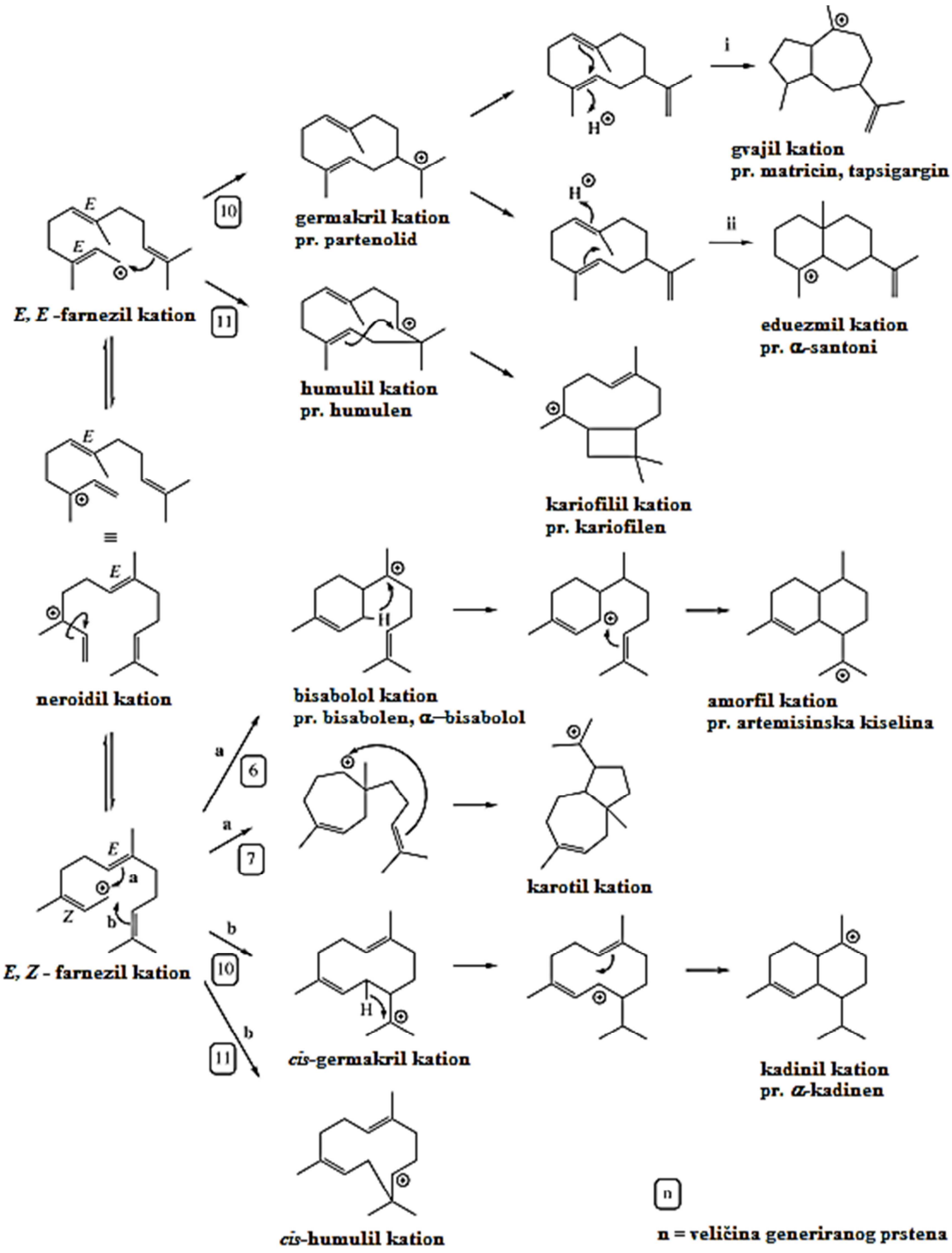
Kondenzacijom DMAPP i IPP uz pomoć enzima prenil-transferaze nastaje geranil-pirofosfat (GPP), prekursor u sintezi monoterpena. Aciklički prekursori geranil-pirofosfat (GPP), neril-pirofosfat (NPP) i linalil-pirofosfat (LPP) ishodne su tvari za sintezu brojnih cikličkih monoterpena. Najčešće će iz navedenih acikličkih pirofosfatnih preteča reakcijama ciklizacije, hidrolize, esterifikacije i drugim nastati ciklički monoterpenski alkoholi, aldehidi, ketoni i esteri.

Seskviterpeni nastaju vezivanjem izoprenske jedinice IPP na geranil-pirofosfat, čime nastaje farnezil-pirofosfat (**slika 2.16**).



Slika 2.16. Nastanak farnezil-pirofosfata iz geranil-pirofosfata; preuzeto i prilagođeno iz [93]

Farnezil-pirofosfat je prekursor za daljnji nastanak seskviterpena, a budući da ima više izoprenskih jedinica i dvostrukih veza, mogućnosti povezivanja, ciklizacije i nastanka mono-, bi- i tricikličkih struktura velike su. Dvostruka veza koja je najbliža pirofosfatu može prijeći u *E*- ili *Z*-konfiguraciju putem ionizacije, pri čemu nastaje nerolidil-pirofosfat kao više vjerojatni oblik iz kojeg, uz pomoć enzima, mogu nastati brojni oblici kationa kao preteče seskviterpenima nastalih ovim putem. Standardna reakcija karbokationa predstavlja najjednostavniji oblik objašnjenja kako nastaju strukturni oblici nekih od seskviterpena kao što je prikazano na **slici 2.17**.



Slika 2.17. Prikaz mogućih oblika seskviterpena nastalih u mevalonskom putu; preuzeto i prilagođeno iz [94]

Lavoslav Ružička još je 1953. godine uveo i opisao značajna pravila u opisu i nastanku terpena, što je s obzirom na malu količinu podataka u to vrijeme bilo briljantno dostignuće. Jedno od tih pravila navodi da svaki član određene grupe terpenoida nastaje iz jedne „roditeljske“ molekule, koja se brojnim pretvorbama pretvara u različite oblike novonastalih molekula. Tako su naprimjer seskviterpeni nastali iz 2E, 6E-farnezil-pirofosfata (FPP) reakcijama ciklizacije, dodavanja funkcionalnih skupina i njihove preraspodjele.[93]

Sve su navedene reakcije katalizirane enzimima i mogu se sažeti kako slijedi:

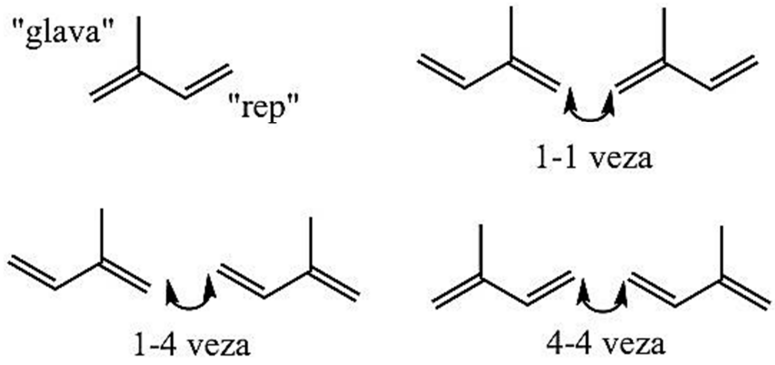
- mevalonska kiselina (MVA) prekursor je svih terpena i nastaje u metabolizmu acetata
- molekule „roditelji“ različitih podskupina terpena su:
    - isopentenil-pirofosfat (IPP) i 3,3 dimetil-alil-pirofosfat (DMAPP) (za hemiterpene, C_5)
    - geranil-pirofosfat (GPP) (za monoterpene, C_{10})
    - 2E, 6E farnezil-pirofosfat (FPP) (za seskviterpene, C_{15})
    - 2E, 6E, 10E geranilgeranil-pirofosfat (GGPP) (za diterpene, C_{20})
    - 2E, 6E, 10E, 14E geranilfarnezil-pirofosfat (GFPP) (za sesterpene, C_{25})
    - skvalen (za triterpene, C_{30})
    - karotenoidi, fitolen.[93]

Centralni događaj u nastanku terpenskih molekula je vezanje IPP-a na početnu „roditeljsku“ molekulu nastalu iz DMAPP-a.[93]

Terpeni čine složenu skupinu spojeva za koju ne postoji jedinstvena nomenklatura. Terpenski spojevi uglavnom kao nastavak imaju -en ili -oid, kao npr. monoterpeni ili monoterpenoidi, iako bi se nastavak -en primarno trebao koristiti za označavanje alkena. Poput ostalih složenih kemijskih spojeva, terpeni imaju i uobičajena, trivijalna imena koja se koriste u znanstvenoj i stručnoj terminologiji, a opisana su i u bazi podataka *Chemical Abstracts*, gdje su im dodijeljeni i redni brojevi kao i puna imena prema IUPAC- nomenklaturi.[94]

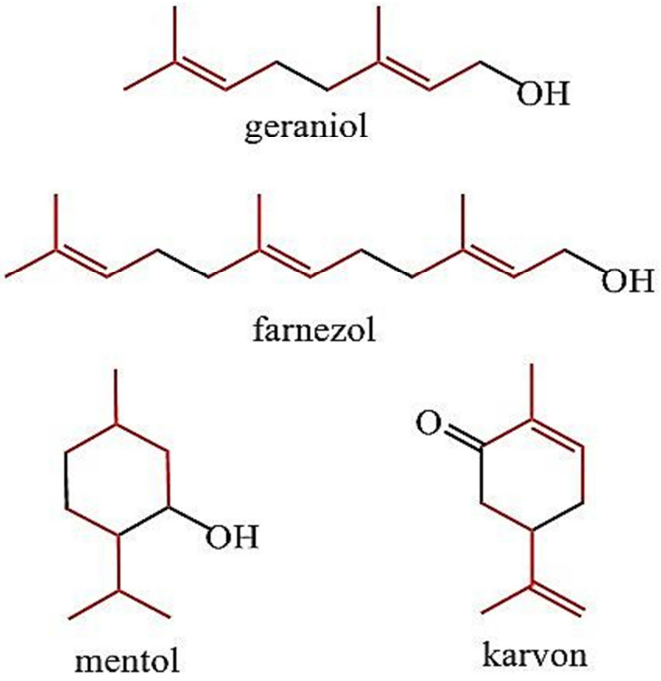
Izoprenske jedinice, formule C_5H_8, povezuju se u složenije oblike terpena, gdje se razgranati dio nazvan „glava“ može vezati s razgranatim ili nerazgranatim dijelom, nazvanim „rep“, druge izoprenske jedinice. Razlikujemo tako tri načina vezivanja izoprenskih jedinica:

glava-glava: vezanje 1-1, glava-rep: vezanje 1-4, i rep-rep: vezanje 4-4 (**slika 2.18**). Kod terpena prevladava vezivanje glave na rep i to se pravilo još naziva i Wallach-ovo pravilo.[93-95]



Slika 2.18. Vezanje izoprenskih jedinica

Terpenske spojeve prema građi dijelimo na acikličke i cikličke. Mogu imati funkcionalne skupine i s obzirom na to svrstavati se u terpenske alkohole, ketone i aldehide. Terpenski spojevi rasprostranjeni su i raznovrsni u prirodi, pa stoga Wallachovo izoprensko pravilo u strukturi nije moguće uvijek lako uočiti (**slika 2.19**).[93]



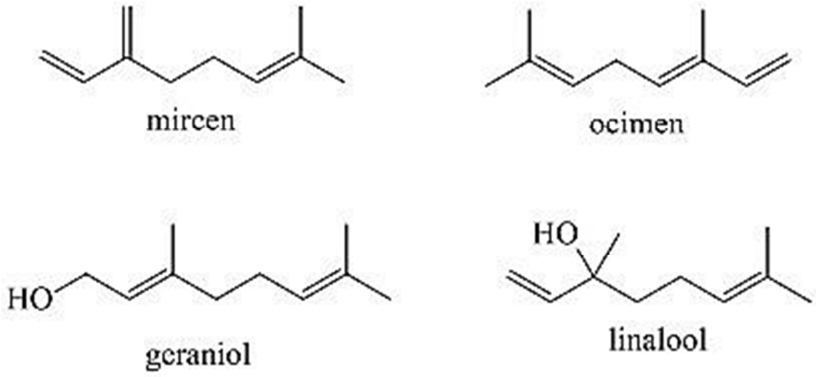
Slika 2.19. Primjeri terpena i C_5-izoprenskih jedinica: geraniol, farnezol, mentol i karvon

2.3.1.1.1. Monoterpeni

Monoterpeni su terpenski spojevi građeni od 10 ugljikovih atoma, koji u svojoj građi imaju dvije izoprenske jedinice. Predstavljaju značajne spojeve u kemijskoj ekologiji, tako *α*-pinen, mircen, geraniol, citrali i drugi predstavljaju značajne spolne feromone, koji su korisni pčelama, dudovom svilcu ili služe kao obrambeni spojevi kod mrava i kornjaša. Kamfor i 1,8-cineol monoterpeni su koje luče posebne vrste biljaka kako bi spriječile razvoj sjemenki vrsta s kojima se natječu za stanište. Mnogi monoterpeni služe privlačenju kukaca.[94]

S obzirom na broj ugljikovih atoma i prisutnost dvostrukih veza ti spojevi mogu imati različite strukturne oblike, pa prema građi razlikujemo acikličke i cikličke monoterpene.

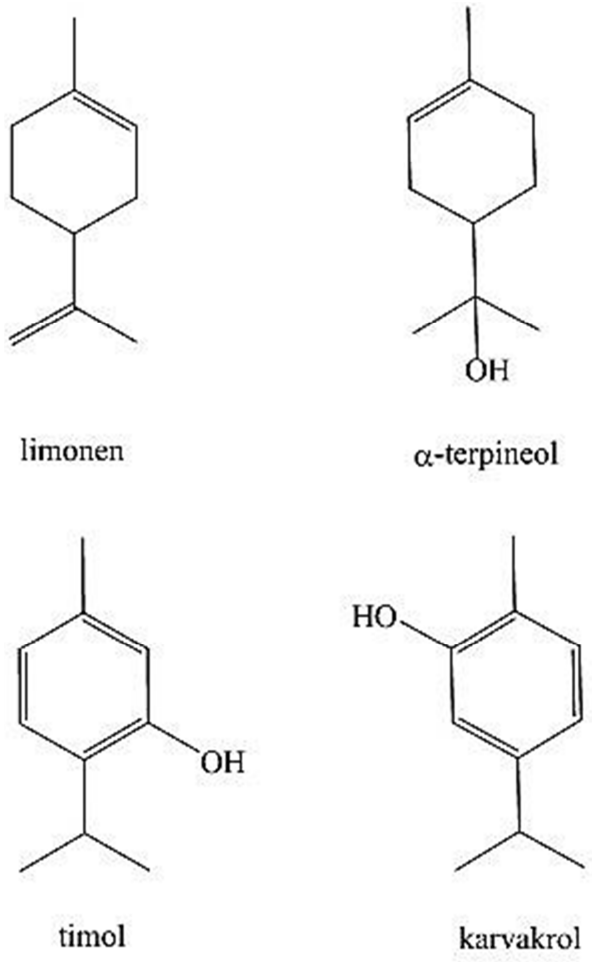
Od acikličkih monoterpena poznati su geraniol, linalool, mircen i ocimen (**slika 2.20**).



Slika 2.20. Aciklički monoterpeni, neoksidirani i oksidirani

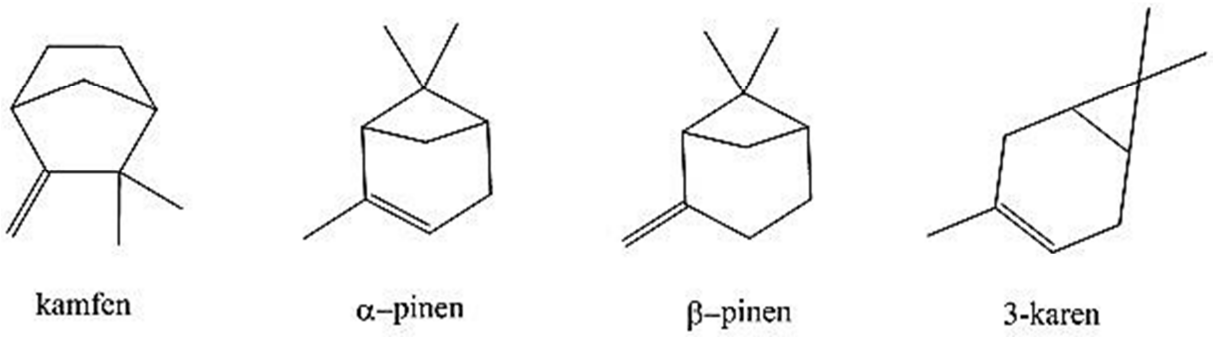
Izoprenska jedinica može se povezati u prsten, pri čemu nastaju monociklički monoterpeni. Tako najpoznatiji monoterpeni imaju prsten sa 6 ugljikovih atoma, a tipična pretvorba acikličkog u ciklički je ciklizacija geranil-fosfata u limonen. Neki od poznatih bicikličkih monoterpena su: *α*-pinen, *β*-pinen, citral, kamfor, timol, karvakrol, mentol, limonen, *α*-terpinen, *p*-cimen (**slika 2.21**).

Za timol i karvakrol važno je naglasiti da iako imaju fenolni prsten, pripadaju monoterpenima jer nastaju u biokemijskom putu mevalonske kiseline.



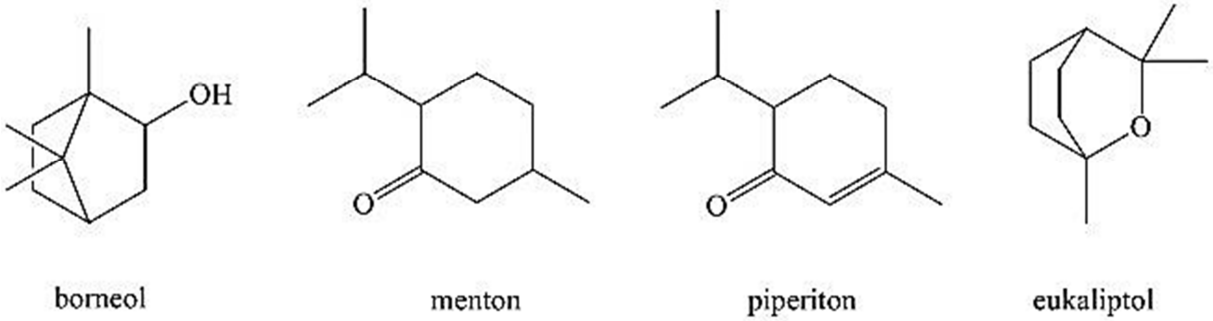
Slika 2.21. Monociklički monoterpeni, neoksidirani i oksidirani

Geranil-fosfat može proći i dva ciklusa ciklizacije, pri čemu mogu nastati biciklički monoterpeni poput pinena (**slika 2.22**). Od drugih bicikličkih monoterpena poznati su još i karen, kamfor, tujen, sabinen, kamfen, borneol, eukaliptol drugi.



Slika 2.22. Biciklički monoterpeni

Monoterpeni mogu imati i različite funkcionalne skupine, pa razlikujemo monoterpenske alkohole, ketone, aldehide, kiseline i estere. U toj skupini nalazimo borneol, menton, piperiton ili eukaliptol (**slika 2.23**).



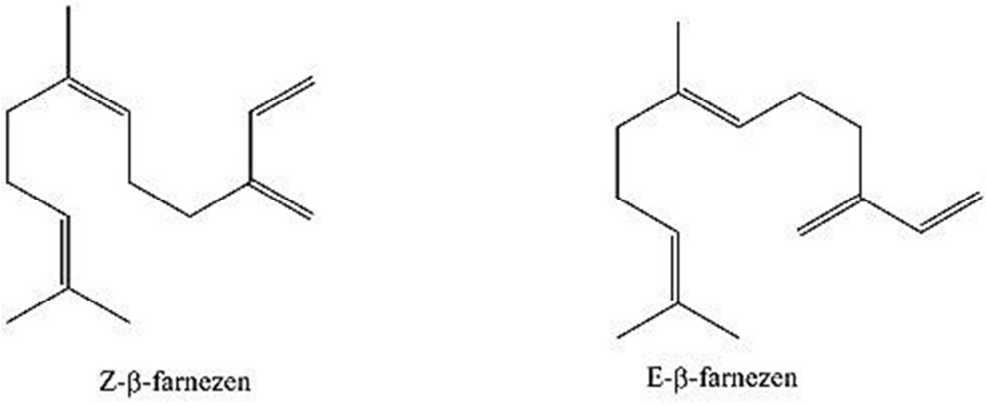
Slika 2.23. Monoterpeni s funkcionalnim skupinama

Poznato je da se ti spojevi nalaze u sastavu eteričnih ulja nekih aromatičnih biljaka kao dominanti spojevi za koje je poznato i da su biološki aktivni te mogu imati povoljan učinak na čovjekovo zdravlje.[94]

2.3.1.1.2. Seskviterpeni

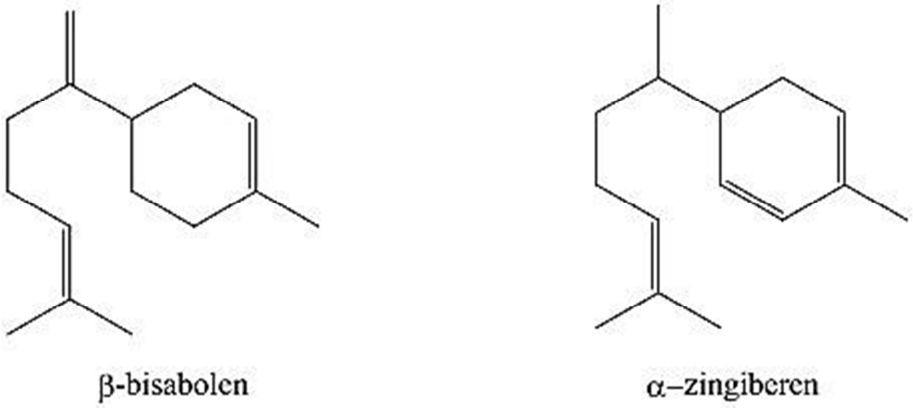
Seskviterpeni su organski spojevi koji se često nalaze i u sastavu eteričnih ulja. Mogu imati značajan učinak u smislu okusa ili mirisa. Istraživanja pokazuju da često nastaju u intercelularnim mjestima, gdje se rijetko nalaze monoterpeni.[94]

Seskviterpeni su spojevi koji u svojoj građi imaju 3 izoprenske jedinice. S obzirom na strukturu možemo ih podijeliti na acikličke, monocikličke, bicikličke, tricikličke itd. Aciklički seskviterpeni su *Z*-*β*-farnezen i *E*- *β*-farnezen (**slika 2.24**).



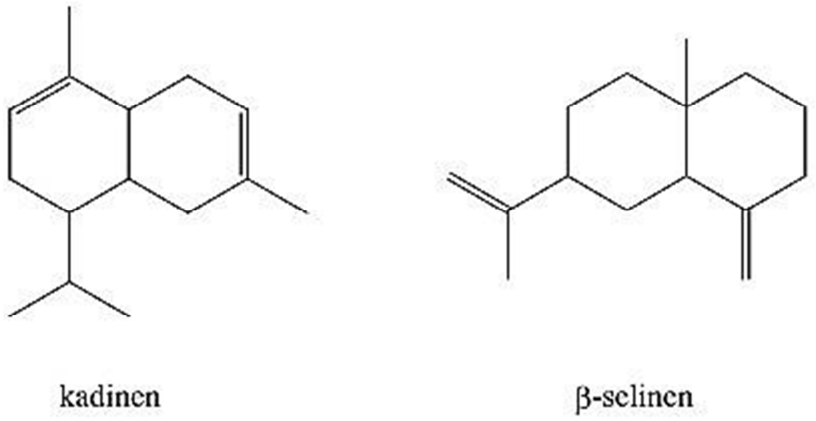
Slika 2.24. Aciklički seskviterpeni Z-*β*-farnezen i E- *β*-farnezen

Izoprenske lančane jedinice mogu se povezati u prsten, pri čemu nastaju monociklički seskviterpeni. Neki od poznatih monocikličkih seskviterpena su α-zingiberen i β-bisabolen (**slika 2.25**).



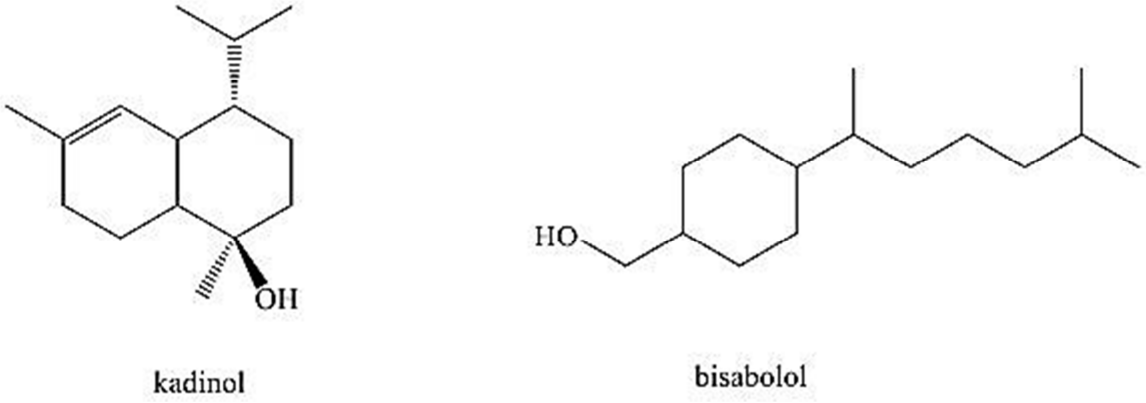
Slika 2.25. Monociklički seskviterpeni β-bisabolen i α-zingiberen

Najpoznatiji seskviterpeni imaju šesteročlani prsten ugljikovih atoma, a tipična pretvorba acikličkog u ciklički je ciklizacija nerolidol-fosfata u farnezil-kation, od kojeg dalje nastaju brojni ciklički kationi kao prekursori seskviterpena. Osim monocikličkih seskviterpena mogu nastati i biciklički poput kadinena i β-selinena (**slika 2.26**).



Slika 2.26. Biciklički seskviterpeni kadinen i β-selinen

Neki od seskviterpena mogu imati i različite funkcionalne skupine, pa razlikujemo seskviterpenske alkohole, ketone i aldehide. U toj skupini nalazimo primjerice kadinol i bisabolol (**slika 2.27**).



kadinol bisabolol

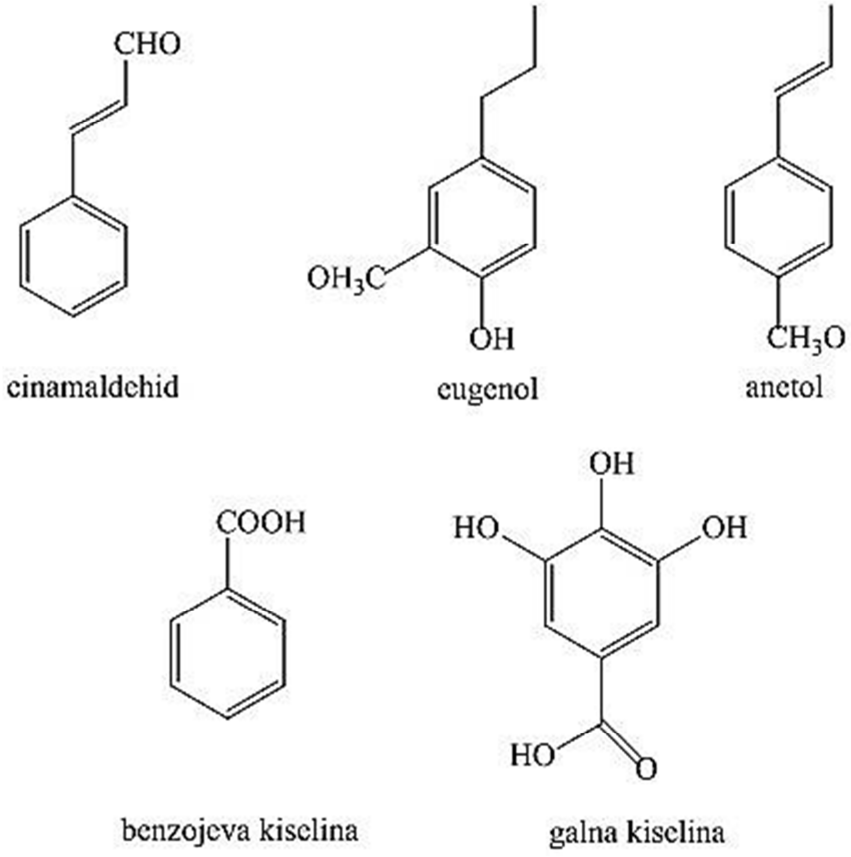
Slika 2.27. Oksidirani seskviterpeni kadinol i bisabolol

U sastavu eteričnih ulja mogu se naći još i seskviterpeni, primjerice aciklički farnezol, monociklički humulen, bisabolen, te biciklički *β*-selinen i *β*-kariofilen.[94]

2.3.1.2. ***Fenilpropanski spojevi***

Važni sekundarni metaboliti koji nastaju od intermedijera iz acetatnog puta uključuju i fenilpropanske spojeve. Fenilpropanski spojevi nastaju kao rezultat šikimatskoga biokemijskog puta, koji se odvija u biljkama i mikroorganizmima, ali ne i životinjama. Centralni spoj u ovom biokemijskom putu je šikiminska kiselina. Šikiminska kiselina nastaje kombinacijom intermedijera primarnih metaboličkih puteva, fosfoenolpiruvata, intermedijera glikolize, i eritroza-4-fosfata, iz puta pentoza fosfata. Iz šikiminske kiseline nastaju aromatične aminokiseline L-fenilalanin, L-tirozin i L-triptofan, a iz njih fenilpropanski spojevi. Fenilpropanski spojevi sadrže u svojoj strukturi fenilni prsten s jednim pobočnim propanskim lancem. Fenilalanin i tirozin su prekursori za sintezu brojnih prirodnih spojeva. Tvore fenilpropansku jedinicu C_6-C_3, iz koje nastaju brojni fenilpropanski spojevi, poput cimetne kiseline, kumarina, lignana, flavonoida i alkaloida. Osim složenih prirodnih spojeva u šikimatskom putu nastaju i jednostavni derivati benzojeve kiseline, kao C_6-C_1 fenilpropanski spojevi. Nastali su direktno iz interemedijera u ranom šikimatskom putu ili od C_6-C_3 fenilpropanskih spojeva. Njim pripadaju cinamaldehid, anetol, eugenol, galna kiselina, *p*-aminobenzojeva kiselina, salicilna kiselina, benzojeva kiselina, vanilin i brojni drugi spojevi (**slika 2.28**).[95]

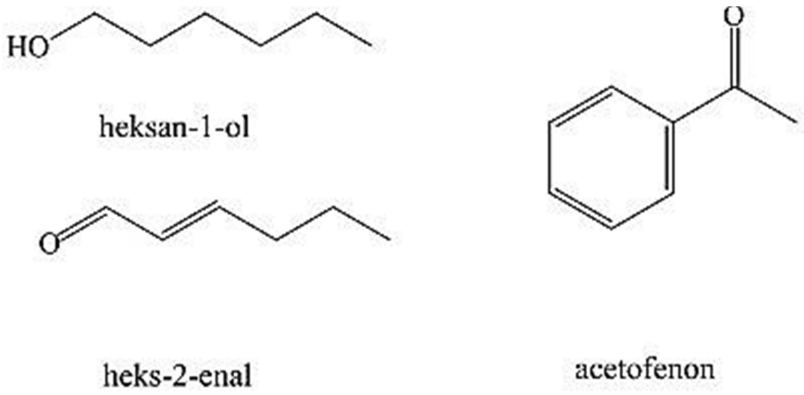
Za fenilpropanske spojeve poznato je da imaju značajan biološki učinak i dobar antioksidacijski potencijal.[96]



Slika 28. Fenilpropanski spojevi cinamaldehid, eugenol, anetol, benzojeva kiselina i galna kiselina.

2.3.1.3. ***Ostali spojevi***

Osim navedenih terpenskih i fenilpropanskih spojeva u sastav eteričnih ulja ulaze i brojni alifatski ugljikovodici i njihovi oksidirani derivati. Tako u sastav eteričnih ulja ulaze i masne kiseline, alkoholi, ketoni, aldehidi, ugljikovodici i derivati s dušikom ili sumporom. Često se ti spojevi nalaze vezani na ugljikohidratne jedinice, pa ih nazivamo glikozidima. Neka eterična ulja sadrže stearoptene, parafinu slične ugljikovodike s 15–30 ugljikovih atoma (**slika 2.29**).[91]



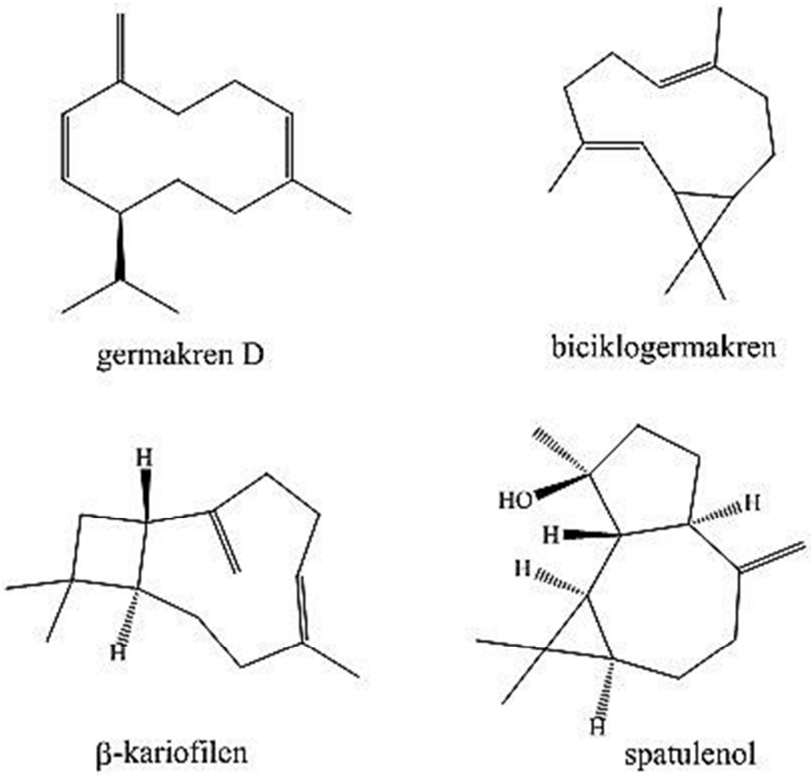
Slika 2.29. Derivati ugljikovodika u sastavu eteričnih ulja

2.3.2. Kemijski sastav eteričnih ulja vrsta roda Centaurea

Dosad je sastav eteričnog ulja istražen kod 47 vrsta roda *Centaurea* sabranih na području Sjedinjenih Američkih Država, Turske, Alžira, Irana, Grčke, Bugarske, Srbije, Italije i Republike Hrvatske.[8, 10-21, 97-134]

Općenito govoreći, eterična ulja vrsta roda *Centaurea* karakterizirana su velikim udjelom seskviterpena, uglavnom neoksidiranih. Najčešći seskviterpeni koji se nalaze u sastavu tih eteričnih ulja su germakren D, biciklogermakren, β-kariofilen, kariofilen-oksid, spatulenol i *α*-kopaen (**slika 2.30**).[8, 10-21, 97-134]

Monoterpeni su u većini vrsta rijetko prisutni i ako su prisutni, čine manje od 1% masenog udjela u eteričnom ulju. Iznimku od tog pravila čine vrste *Centaurea hierapolitana, Centaurea cadmea, Centaurea calolepis, Centaurea cariensis* subsp. *maculiceps, Centaurea cariensis* subsp. *microlepis, Centaurea ensiformis, Centaurea reuterana.* var. *reuterana, Centaurea cyanus, Centaurea depressa, Centaurea urvillei* subsp. *urvillei* i *Centaurea saligna* iz Turske, gdje su monoterpeni pronađeni u količinama od 4.1% do 28.4% s karvakrolom kao dominantnim spojem.[104,107] Najčešći monotepreni koji se javljaju u eteričnim uljima vrste *Centaurea* su: *α*-pinen, *β*-pinen, mircen, *p*-cimen i limonen. Značajan udio monoterpena pronađen je kod vrste *Centaurea zuvandica*, gdje su monoterpeni *α*-pinen i *α*-terpineol pronađeni u udjelima od 11,6%-21,3%.[111]



Slika 2.30. Seskviterpeni identificirani u eteričnim uljima vrsta roda *Centaurea*

Od diterpenskih spojeva najčešće je prisutan alkohol fitol.[13-21, 115]

U sastavu eteričnih ulja vrsta roda *Centaurea* često se kao dominanti spojevi nalaze neterpenski derivati poput masnih kiselina, alkohola, aldehida, estera i ugljikovodika, gdje heksadekanska i linolenska kiselina često čine značajan udio.[8, 10-21, 107]

Sastav eteričnog ulja dosad je ispitan samo u dvije vrste roda *Centaurea* u Republici Hrvatskoj, kod vrste *Centaurea gloriosa* var. *multiflora* Radić i *Centaurea spinosociliata* Seenus.[114,119] Navedene dvije vrste ne pripadaju sekcijama kojima pripadaju vrste roda *Centaurea* proučavane u ovom doktorskom radu.

Iz sekcije *Carduiformes*, kojoj pripada *C. ragusina*, istraživana u ovom doktorskom radu, dosad nije istražena ni jedna vrsta.

Centaurea solstitialis dosad je najbolje istražena od vrsta proučavanih u ovom doktorskom radu. Najzastupljenije komponente eteričnih ulja *C. solstitialis* sadržavale su terpene svrstane

većim dijelom u seskviterpene i oksidirane seskviterpene, zatim monoterpene kao i neterpenske spojeve, od kojih su značajni bili ugljikovodici i kiseline. Germakren D, *β*-kariofilen i heksadekanska kiselina nalaze se u svim proučavanim eteričnim uljima vrsta roda *C. solstitialis* bilo kao dominantni spojevi bilo s manjim udjelima.[8, 10-22, 97-138]

C. solstitialis pripada sekciji *Dumulosae*, iz koje je dosad istražen sastav eteričnog ulja sljedećih vrsta: *C. calcitrapa, C. aeolica* i *C. diluta.* Zajednička je svim eteričnim uljima od vrsta *C. calcitrapa* i *C. aeolica* prisutnost kariofilen-oksida (3,2% i 4,3–7,4%) među dominantnim spojevima. β-eudezmol bio je prisutan među dominantnim spojevima samo u eteričnim uljima *C.aeolitica* (4,4%–26,3%), dok je β-kariofilen (5,3%) bio prisutan samo kod vrste *C. calcitrapa* među dominantnim spojevima. Germakren D nalazi se samo u sastavu eteričnog ulja *C. calcitrapa* s malim udjelom od 1,2%, dok ga kod vrsta *C. aeolitica* i *C. diluta* uopće nema. Spojevi kariofilen-oksid, β-eudezmol i β-kariofilena nisu zabilježeni kod vrste *C. diluta,* no kod njezina eteričnog ulja zabilježeni su kao dominantni spojevi pentakozan (7,1%) i heksadekanska kiselina (21,3%). Heksadekanska kiselina nije zabilježena kod vrste *C. calcitrapa*, dok se kod vrste *C. aeolitica* nalazi među dominantnim spojevima s udjelima u rasponu od 3,6% do 24,7%. Trikozan je prisutan u svim trima vrstama, *C. calcitrapa, C. aeolica* i *C. diluta*, s udjelima od 3,8%; 1,2%–13,0% i 0,3%.[108,109, 120]

Sastav eteričnog ulja *C. rupestris* dosad je istražen samo na vrsti sabranoj u Italiji. U navedenom istraživanju dominantni spojevi u sastavu eteričnog ulja bili su germakren D (42,3%), β-faznezen (8,3%), β-kariofilen (8,0%) i α-faznezen (5,2%).[116]

Iz sekcije *Hyaleoloma* (*Akrocentron*), kojoj pripada *C. rupestris*, dosad je istražen sastav eteričnog ulja sljedećih vrsta: *C. pseudoscabiosa* i *C. urvilei*. Eteričnim uljima od dosad istraživanih eteričnih ulja *C. pseudoscabiosa* i *C. urvilei* zajednička je prisutnost germakrena D, β-kariofilena i kariofilen-oksida u sastavu eteričnog ulja navedenih vrsta. Kod vrste *C. pseudoscabiosa* sva tri spoja činila su dominantne komponente u sastavu eteričnog ulja, a kod iste vrste uopće nisu bili prisutni ugljikovodici i kiseline u sastavu eteričnog ulja. Kod vrste *C. urvilei* germakren D, β-kariofilen i kariofilen-oksid nalazili su se u vrlo malim udjelima, a značajan su udio imali karvakrol (12,4%) i kiseline kako slijede: heksadekanksa (26,4%,; dodekanska (9,4%) i tetradekanska (4,1%).[10, 104]

2.3.3. Kemotaksonomija

U botaničkoj taksonomiji ukupne morfološke karakteristike jedinke razmatraju se kako bi se biljna vrsta što preciznije odredila. Najvažniji kriteriji u botaničkoj sistematici odnose se na opće anatomske karakteristike, embriologiju, izgled polena i citogenetiku. U većini slučajeva ovi kriteriji daju jasnu sliku i precizno definiraju pojedinu biljnu vrstu, no u nekim slučajevima ni to nije dovoljno. Stoga je potrebno uvesti i dodatan kriterij kojim je moguće precizno definirati pojedinu vrstu, a to je kemijska karakterizacija ili kemotaksonomija.[63, 64, 135, 136]

Važno je reći i da su morfološke karakteristike vrste promjenjive – potrebno je imati cijelu jedinku da bi se utvrdila taksonomija, dok se citogenetska istraživanja mogu raditi samo sa živim jedinkama. Stoga je kemotaksonomija u prednosti jer se kemijski spojevi mogu izolirati i iz mrtvih dijelova biljaka poput kore i drveta, pa nije potrebna cijela jedinka, već samo dijelovi poput listova, cvjetova i korijena kako bi se izolirali kemijski spojevi i utvrdio kemotaksonomski položaj biljne vrste.[63, 64]

Kemotaksonomija biljaka može se definirati kao znanstvena disciplina koja koristi kemijske spojeve nastale u biljkama u svrhu preciznijeg taksonomskog određivanja pojedine biljne vrste i njzine što preciznije definicije u okviru botaničke sistematizacije.[9, 63, 64]

Ta je disciplina nastala još u 16 stoljeću, a njezini su začetnici botaničari Nehemiah Grew i James Petiver. Početkom 20. stoljeća interes za kemotaksonomiju je porastao, a razvojem kromatografskih tehnika dobio je i veći značaj. A. P. de Canadoll i Greshoff predvidjeli su značaj kemotaksonomije predviđajući da će ona čovjeku omogućiti lakšu potragu za korisnim industrijskim i medicinskim biljkama te biti značajna u biljnoj taksonomiji budućnosti.[63, 64]

Kemotaksonomija omogućava preciznije definiranje pojedinih vrsta i dovodi u blisku vezu kemijske spojeve u biljkama te taksonomski i evolucijski položaj vrste. Koristi se kako bi se poboljšala postojeća botanička klasifikacija vrsta i obogatilo znanje o pojedinim vrstama i njihovoj biološkoj povezanosti.[63, 64]

S obzirom na dominantne klase spojeva biljke općenito dijelimo na biljke s alkaloidima, flavanoidima, ugljikohidratima, karotenoidima, terpenoidima i masnim kiselinama. Neki autori kemijske spojeve u biljkama dijele na one s malom molekularnom masom, kamo pripadaju aminokiseline, alkaloidi, masne kiseline, flavanoidi i terpenoidi, te one s većom molekularnom masom, u koje ubrajamo proteine, složene polisaharide, DNA i RNA molekulu.

Kako bi kemotaksonomija imala značajan doprinos u botaničkoj taksonomiji pojedinih vrsta, potrebno je značajno proširiti postojeće znanje o biljnom metabolizmu i njegovim nastalim produktima. Kemotaksonomija može se temeljiti na opisivanju kemijskih spojeva nastalih u biljkama, ali i na definiranju metaboličkih puteva iz kojih ti spojevi nastaju.[63, 64, 89]

Budući da je rod *Centaurea* vrlo složen i teško ga je taksonomski precizno razdijeliti, osim citogenetskih istraživanja korisna su i istraživanja kemizma biljke. Poznato je da se kod *Asteraceae* i kod roda *Centaurea* diterpeni, prisutnost seskviterpenskih laktona i terpena koriste kao kriteriji u kemotaksonomiji. Tako je uz pomoć statističkih analiza i podataka o sastavu eteričnog ulja, temeljenim na analizama plinske kromatografije, moguće napraviti kemotaksonomsku raspodjelu vrsta unutar toga ovog roda.[8, 22, 42, 137,138]

2.3.4. Biološka aktivnost eteričnih ulja

Eterična ulja koriste se u brojnim kulturama širom svijeta. Mnoga eterična ulja posjeduju biološki učinak na živa bića u smislu antioksidacije i antimikrobnog učinka. Zbog tih svojstava često se koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.[22, 23, 92, 139, 140]

Postoje eterična ulja koja nemaju značajan antimikrobni učinak, no ipak se koriste u kozmetičkoj, prehrabenoj i farmaceutskoj industriji kao otapala za biološki aktivna eterična ulja ili kao izvor hranjivih masnih kiselina.[139]

Godišnje se tone hrane baci uslijed oksidacijskog i mikrobiološkog oštećenja hrane. To predstavlja goleme ekonomske gubitke i opasnost za ljudsko zdravlje. Pravilnim postupanjem s hranom prilikom njezine pripreme, pohranjivanja i distribucije takve se štete mogu izbjeći. Prirodni kemijski spojevi koji imaju dobra antioksidacijska i antibakterijska svojstva mogu uvelike pomoći. Poznato je da su biljke porodice *Asteraceae* bogate biološki aktivnim spojevima, no i dalje postoji potreba za istraživanjima i potragom za prirodnim spojevima.[23, 92, 140]

Danas poznajemo više od 1300 biljnih vrsta koje su izvor dobrih antimikrobnih tvari, dok su kod više od 250 000 biljnih vrsta pronađeni razni biološki važni spojevi.[88]

Biološki aktivni spojevi koristili su se i zapadnoj i u istočnoj tradicionalnoj medicini u različite medicinske svrhe. Tako je poznato da su eterična ulja korištena kao baktericidi, virucidi, fungicidi, antiparaziti, insekticidi ili u citotoksične svrhe zbog sadržaja vrijednih biološki aktivnih spojeva u svom sastavu.[22, 23]

Često se dogodi da je biološka aktivnost eteričnih ulja veća i značajnija od samih čistih spojeva koji se nalaze u sastavu toga istog eteričnog ulja. To je rezultat zajedničkog djelovanja više biološki aktivnih komponenti s istim biološkim učinkom. Također je zahvaljujući prisustnosti više biološki aktivnih komponenti toksičnost eteričnog ulja često manja od samih čistih komponenti, što se naziva i fenomenom „buffering“ ili ublažavanja. Iz

navedenih razloga eterična se ulja se i danas koriste za liječenje ili poboljšavanje nekih medicinskih stanja.[88]

Poznato je da se neka eterična ulja u etnomedicini koriste od davnina jer je poznat njihov dobar biološki učinak. Tako se koriste ulja origana, majčine dušice, lavande, bosiljka, metvice i mnogi drugi u ljekovite svrhe kao i u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.[89]

Vršni dijelovi vrsta roda *Centaurea* korišteni su u tradicionalnoj medicini za tretiranje bolesti poput malarije, peptičnog čira, usnog herpesa, obične prehlade, dispepsije i nekih gastroenteroloških poremećaja.[20,141-145]

2.3.4.1. ***Antioksidacijski učinak eteričnih ulja***

Brojne ljudske bolesti karakterizirane su oksidacijskim stresom unutar stanica. To je stanje u kojem je povećana razina reaktivnih kisikovih spojeva koji mogu prouzročiti oštećenja stanice, što stanicu može odvesti u patološko stanje i smrt.[146, 147]

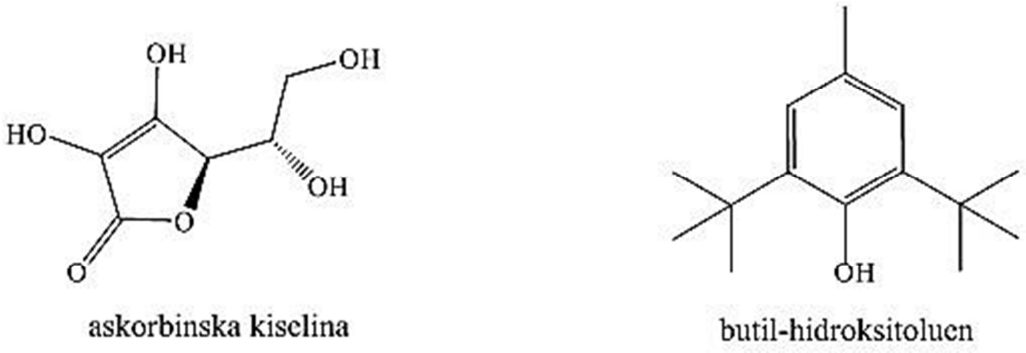
Oksidacijski metabolizam ključan je za stanični rad i preživljavanje velikog dijela živih bića, a čovjeka posebno. Popratna pojava tog procesa je stvaranje slobodnih radikala, koji mogu štetno utjecati na stanicu, njezine stanične dijelove i funkcije stvarajući složen fiziološki poremećaj koji zovemo oksidativni stres.[148]

Čovjekove stanice posjeduju unutrašnje mehanizme obrane od oksidativnog stresa u obliku enzima, poput superoksid-dismutaze, katalaze, glutation-peroksidaze, kao i aktivnih tvari poput vitamina C, urične kiseline i serumskog albumina. Kada se dogodi prekomjerno stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS = engl. Reactive oxygen species), enzimi stanične obrane od oksidativnog stresa mogu bili nedovoljni za ublažavanje posljedica, pa može doći do oštećenja staničnih makromolekula poput oksidacije membranskih lipida, staničnih proteina, DNA i enzima, što u konačnici može dovesti do smrti stanice, apoptoze.[146-149]

„Hipoteza antioksidansa“ kaže da se uzimanjem antioksidansa prehranom može spriječiti ili ublažiti oksidativni stres povezan s nekim oboljenjima. Sinergistički učinak među različitim antioksidansima pritom ima veliki značaj. Brojne su studije u kojima se proučavao način prehrane i pojava pojedinih oboljenja dale podršku u traženju dobrih antioksidansa koji bi se mogli unositi hranom. U proučavanju utjecaja antioksidansa na čovjekovo zdravlje ne smijemo zaboraviti i da postoje studije koje pokazuju upravo suprotan učinak te da stanica već posjeduje unutarstanične spojeve i enzime koji imaju ulogu staničnih antioksidansa.[140, 149]

Spojevi koji su prisutni u maloj koncentraciji značajno usporavaju ili zaustavljaju reakciju oksidacije određenog supstrata nazivamo antioksidansima. Mehanizam njihova djelovanja može se temeljiti na različitim tipovima reakcija, no najčešći oblici uključuju prijenos elektrona.[148]

Poznati dobri antioksidansi su askorbinska kiselina ili vitamin C, butil-hidroksitoluen (BHT) i butil-hidroksianizol (BHA) prikazani na **slici 2.31**.



askorbinska kiselina butil-hidroksitoluen

Slika 2.31. Antioksidansi askorbinska kiselina i butil-hidroksitoluen

Eterična ulja ili njihove komponente koje imaju dobra antioksidacijska svojstva mogu se koristiti kao antioksidansi. Brojni prirodni spojevi imaju dobra antioksidacijska svojstva, među kojima se posebno ističe skupina spojeva flavanoida. U njihovoj strukturi značajan je benzenski prsten kao i OH-skupina u blizini π-konjugiranog elektrona, koji sudjeluju u reakciji primanja elektrona, prilikom čega dolazi do uklanjanja slobodnog radikala i nastanka spoja koji nije opasan za stanicu. Osim tih spojeva postoje i brojni drugi koji u svom sastavu imaju npr. metalni ion, zaslužan za dobru antioksidacijsku aktivnost.[29,140,150-153]

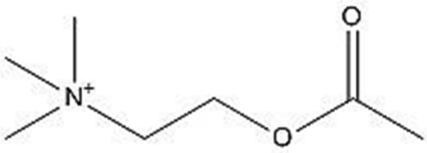
Oksidacija može uzrokovati oštećenja i u hrani, gdje kao posljedicu imamo smanjena hranjiva svojstva, svježinu i sigurnost hrane. Izračunato je da se oko polovica uzgojenog svjetskog voća i povrća baci zbog oksidacijskog oštećenja tih namirnica nakon sabiranja.[148]

Antioksidacijska svojstva biološki aktivnih spojeva mogu se koristiti u tretiranju brojnih bolesti gdje je oksidativni stres jedan od ključnih uzroka. Oksidativni stres smatra se odgovornim za brojne bolesti kod čovjeka kao što su kardiovaskularne bolesti, Alzheimerova bolest (AD), Parkinsonova bolest i mnoge druge.[146, 147]

2.3.4.2. ***Inhibicija enzima kolinesteraza eteričnim uljima***

Za Alzheimerovu bolest (AD) poznato je da su kod patoloških nalaza mozga vidljivi dokazi o prisutnosti oksidativnog stresa u mozgu. Osim znakova postojanja oksidativnog stresa u mozgu oboljelih od AD-a karakteristična je i niska razina sinaptičkog neurotransmitera acetilkolina (ACh).[153-155]

Acetilkolin je ester octene kiseline i alkohola kolina. Nalazimo ga i u kralješnjaka i člankonožaca (**slika 2.32**). U centralnom živčanom sustavu, u živčanim sinapsama, ACh se otpušta u sinaptičku šupljinu i prenosi impuls s jedne živčane stanice na drugu.[155]



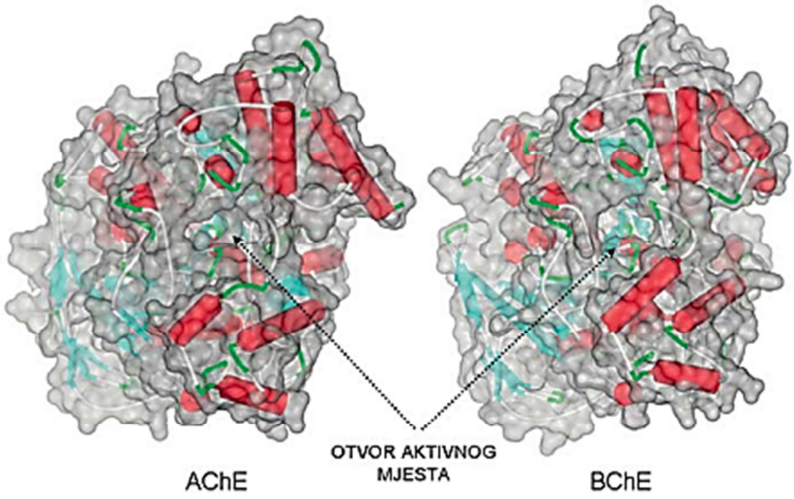
Slika 2.32. Neurotransmiter acetilkolin

ACh ima kratak poluživot budući da ga u sinaptičkoj šupljini brzo hidrolizira enzim acetilkolinesteraza (AChE), nakon čega dolazi do ponovne polarizacije postsinaptičke membrane i impuls prestaje. To je jedan od najučinkovitijih enzima s konstantom brzine za ljudsku AChE od k_{cat} = 400 000 min^{-1}.[145, 146, 148, 155-157]

Kako se acetilkolin uklanja razgradnjom, a ne difuzijom iz sinaptičke pukotine, njegovom hidrolizom AChE kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičnoj sinapsi centralnoga i

perifernoga živčanog sustava. Razina AChE ostaje nepromijenjena ili smanjena kod pacijenata s AD-om, dok razina srodnog enzima butirilkolinesteraze BChE raste. Oba enzima važan su terapeutski cilj u liječenju brojnih bolesti koje su uzrokovane promjenom razine ACh. [28, 145, 146, 148, 153, 155-159]

Prema enzimskoj nomenklaturi iz 1992. godine, kolinesteraze se svrstavaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i pod-podskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina (EC 3.1.1) **slika 2.33**. [160]



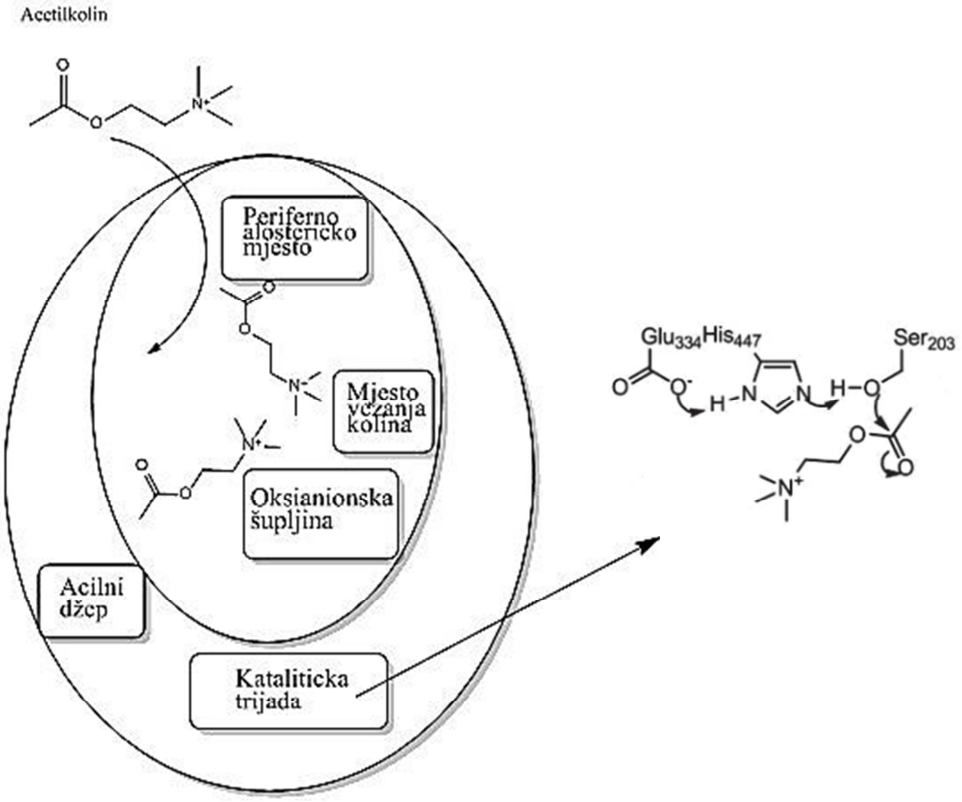
Slika 2.33. Kristalna struktura ljudske acetilkolinesteraze (AChE) i ljudske butirilkolinesteraze(BChE), preuzeto iz [156]

Kolinesteraze su građene od 12 β-nabranih ploča okruženih i s 14 α-uzvojnica, što obje kolinesteraze klasificira u skupinu hidrolaza α/β-strukture. Na **slici 2.33.** označene su α-uzvojnice crvenom bojom, a plavom bojom β-nabrane ploče. Zelenom bojom označene su petlje, a sivom površina enzima koja je dostupna vodi. Strelicom je označen otvor aktivnog mjesta svake od kolinesteraza koji je građen od specifičnih aminokiselina.[156,]

Iako postoji varijabilnost u građi AChE različitih vrsta ili organizama, aminokiseline koje određuju aktivno mjesto visoko su konzervirane.

Aktivno mjesto AChE i BChE veliko je oko 20 x 5Å i sadrži četiri domene koje imaju specifičnu funkciju, a to su:

- katalitičko mjesto koje čini katalitička trijada aminokiselina serin (Ser), glutaminska kiselina (Glu) i histidin (His): Ser-His-Glu s oksianionskom šupljinom
- kolinsko mjesto koje je važno za stabilizaciju pozitivno nabijenog kvaternog dijela acetilkolina
- acilni džep u koji se smješta acilni dio supstrata
- periferno mjesto smješteno na rubu ždrijela (**slika 2.34**).[156]



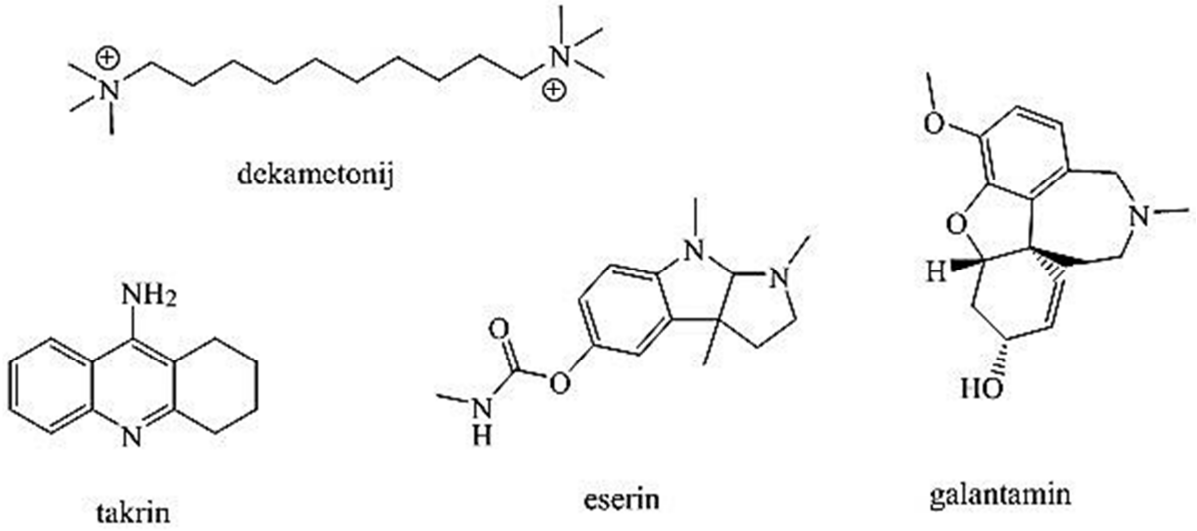
Slika 2.34. Shematski prikaz aktivnog mjesta acetilkolinesteraze za razgradnju supstrata acetilkolina

Zahvaljujući razlikama u aktivnom mjestu AChE i BChE ta dva enzima imaju različitu katalitičku aktivnost i specifičnost vezanja supstrata, liganada kao i inhibitora. Tako AChE ima visoku specifičnost za acetilkolin, ali ne može katalizirati supstrate veće od propionilkolina, dok BChE katalizira veći broj estera poput propionilkolina i benzoilkolina. Unatoč razlikama u strukturi aktivnog mjesta mehanizam hidrolize supstrata kod oba je enzima jednak i odvija se u više reakcijskih stupnjeva, koji uključuju nastajanje Michaelisova

kompleksa, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom, nakon čega može nastupiti nova kataliza acetilkolina.

Zbog drugačije građe aktivnog mjesta afinitet pojedinih inhibitora za oba enzima nije jednak, pa se stoga istražuju potencijalni inhibitori koji će imati selektivnost u odnosu na jedan od enzima u svrhu korištenja u terapijama bolesti. Inhibitori kolinesteraza mogu se vezati ireverzibilno kovalentnim vezama za serin katalitičke trijade ili reverzibilno nekovalentnim vezama unutar aktivnog mjesta.[156]

Dosad poznati lijekovi koji se koriste u liječenju AD-bolesti izolirani su iz biljnih dijelova i koriste se kao terapeutski lijekovi koji inhibiraju kolinesteraze. U tu skupinu ulaze alkaloidi huperzin, solanin i solanidin, zatim flavonoid galangin, karbamat fizostigmin ili, drugim imenom, eserin, amin galantamin i drugi. Od sintetskih inhibitora u liječenju AD-a koriste se takrin, eserin i rivastigmin prikazani na **slici 2.35**.[155, 156]



Slika 2.35. Struktura spojeva koji se koriste kao inhibitori kolinesteraza: dekametonij, takrin, eserin i galantamin

Budući da većina današnjih komercijalnih lijekova koji se koriste u liječenju AD-a ima uzak terapeutski učinak, kratak poluživot, snažne nuspojave i toksični učinak, potraga za lijekovima prirodnog podrijetla koji će imati smanjenu toksičnost, a povećan farmakološki učinak i dalje traje. Biljke su i dosad bile važan izvor biološki aktivnih tvari te je daljnje istraživanje potencijalnih inhibitora kolinesteraza iz biljaka nužno.[155, 161,162]

Neki od biološki aktivnih spojeva iz eteričnih ulja pokazali su dobru inhibiciju kolinesteraza poput eserina ili α-pinena.[28,153,155, 158, 163, 164] Male lipofilne molekule, poput hlapljivih komponenti iz eteričnih ulja, lako mogu proći kroz barijeru krv-mozak, te su stoga zanimljive u smislu istraživanja potencijala inhibicije kolinesteraza.[28]

Zbog povezanosti AD-a s oksidacijskim stresom bilo bi značajno pronaći prirodni kemijski spoj koji ima dobar antioksidacijski potencijal i dobru inhibiciju kolinesteraza.

Osim u tretiranju bolesti kod ljudi AChE je važna i kao ciljani enzim u borbi protiv štetnih insekata. Poznato je i da biljke posjeduju kemijske komponente koje mogu biti dobri insekticidi.[90, 155, 156, 165] Tako se recimo karbaril, inhibitor AChE, koristi kao insekticid zbog svoje niske toksičnosti za sisavce.[156]

Budući da se vrste roda *Centaurea* oprašuju kukcima, sastav eteričnog ulja može imati veze s procesom oprašivanja i omogućiti kemijski utjecaj na kukce u svrhu smanjivanja štete u poljoprivredi koju mogu prouzročiti neke od invazivnih vrsta *Centaurea*. Stoga je važno odrediti i sadržaj eteričnog ulja vrsta *Centaurea* i njegov utjecaj na AChE.[96, 97]

Biološka aktivnost prirodnih spojeva iz eteričnih ulja kao potencijalnih inhibitora acetilkolinesteraze i potencijalno dobrih insekticida potakla je brojna istraživanja prirodnih spojeva u posljednje vrijeme.[157] U literaturnim nalazima zabilježeno je samo jedno istraživanje inhibicije AChE i BChE eteričnim uljima vrsta roda *Centaurea*: *Centaurea lycopifolia*, *Centaurea balsamica* i *Centaurea iberica*.[127]

2.3.4.3. ***Antimikrobni učinak eteričnih ulja***

Rezistencija mikroorganizama na brojne trenutne lijekove koji se koriste postala je globalni svjetski zdravstveni problem. Mnoge su je bakterije tijekom vremena razvile kao odgovor na neselektivno korištenje antibiotika i stvorile otpornost na više različitih vrsta terapeutika. Neke Gram-negativne bakterije pokazuju rezistenciju čak i na modernu antibakterijsku kemoterapiju. Stoga postoje velik interes i potražnja za novim lijekovima protiv patogenih mikroorganizama koji će se moći koristiti zbog svojih antimikrobnih svojstava i riješiti taj globalni problem. Biološki aktivni spojevi izolirani iz biljaka mogu biti dio toga rješenja.[90, 168, 169]

Eterična ulja su smjese biološki aktivnih spojeva koji mogu imati dobar antibakterijski, antivirusni, antifungalni i insekticidni učinak. Brojne studije pokazale su da eterična ulja mogu imati povoljan inhibitorni učinak na patogene u hrani kao i na brojne uzročnike bolesti kod ljudi.[22, 90, 91]

U sastavu eteričnih ulja nalaze se brojne komponente u različitim udjelima,većim, manjim ili u tragovima. Obično se komponente koje se nalaze u većim količinama u sastavu eteričnih ulja promatraju kao najzaslužnije za dobru antimikrobnu aktivnost, poput mono- i seskviterpena, ugljikohidrata, fenola, alkohola, etera, aldehida i ketona.[35, 90, 91]

Eterična ulja koja u svom sastavu imaju aldehidne ili fenolne komponente, poput karvakrola, citrala, eugenola, timola i cinnamaldehida, pokazuju najbolji antimikrobni učinak. Eterična ulja s velikim udjelom ketona ili estera, poput β-miricena, α-tujona ili geranil-acetata, imaju slabiji antimikrobni učinak od gore navedenih.[90, 91]

Osim navedenog poznato je i da masne kiseline, posebno one nezasićene, mogu imati značajan antimikrobni učinak. Iako mogu imati slabiji učinak od kemijskih antimikotika, korištenje masnih kiselina u te svrhe ima ekološke posljedice s kojima se lakše nositi. Važno je također znati da se masne kiseline koriste u preradi hrane i da patogene gljivice teško razvijaju otpornost njih.[169]

Općenito govoreći, mehanizam reakcije eteričnog ulja na mikroorganizme je skup više složenih reakcija koje se odvijaju na bakterijskom staničnom zidu i time uzrokuju baktericidnu ili bakteriostatsku aktivnost.[88]

Sinergijski učinak je pojam koji objašnjava biološko djelovanje više spojeva koji imaju isti učinak i istovremenim djelovanjem imaju bolji biološki učinak od onog kada djeluju samostalno. To se događa stoga što više različitih kemijskih spojeva iz eteričnog ulja djeluje na razna ciljna mjesta i putem različitih mehanizama djelovanja, čime se postiže višestruk i bolji učinak nego ukoliko djelujemo samo s jednom kemijskom komponentom.[22, 91, 189]

Poznato je da su eterična ulja nekih vrsta biljaka roda *Centaurea* ispitivana na potencijalnu antimikrobnu aktivnost budući da mogu biti izvor spojeva sa širokim rasponom antimikrobnih učinaka. Eterična ulja nekih biljaka roda *Centaurea* pokazala su antibakterijski učinak na odabrane Gram-pozitivne bakterije, Gram-negativne baterije i gljivice u rasponu od slabog preko umjerenog do snažnog.[13, 17, 18, 35, 102, 103, 124, 138]

Antimikrobna aktivnost i antioksidacijski potencijal hlapljivih spojeva na odabrane bakterije i gljivice istraživan je samo kod jedne vrste, *Centaurea gloriosa* var. *multiflora* Radić sabrane na području Republike Hrvatske.[119]

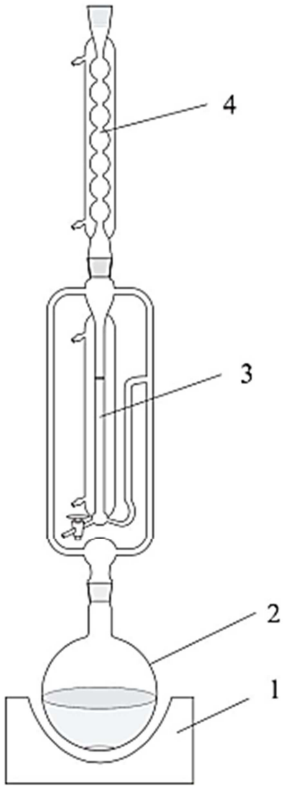
2.3.5. Metode izolacije eteričnih ulja

Svim procesima odjeljivanja smjesa zajednička je raspodjela sastojaka smjese između dviju faza koje je nakon toga moguće odvojiti. Budući da su eterična ulja smjese organskih i lako hlapljivih spojeva, koji se javljaju u malim udjelima i različito se otapaju u vodi i organskim otapalima, moguće ih je izolirati poznatim metodama odjeljivanja.[171]
Metode izolacije eteričnog ulja značajno utječu na kemijski sastav smjese eteričnog ulja. Budući da se radi o spojevima koji su lako hlapljivi, hidrofobni i malih relativnih molekulskih masa, ključno je odrediti način na koji ćemo ih odvojiti od vodenog dijela biljnog materijala. Postoji nekoliko načina ekstrakcije koji se koriste u tu svrhu, poput hladnog prešanja, destilacije vodenom parom, ekstrakcije organskim otapalom i druge.[91]

Najčešće korištene metode izolacije eteričnog ulja su metoda destilacije vodnom parom i ekstrakcija organskim otapalima.

2.3.5.1. ***Destilacija vodenom parom***

Destilacija je metoda izolacije koja omogućava odjeljivanje sastojaka smjese čiji se omjeri raspodjele u parnoj fazi i otopini bitno razlikuju. Ukoliko jedna komponenta ima visok omjer raspodjele u usporedbi s drugim sastojcima smjese, tada je odjeljivanje pomoću destilacije jednostavan proces.[171]



Slika 2.36. Aparatura za hidrodestilaciju: 1) kalota, 2) tikvica s okruglim dnom, 3) aparat po Clavengeru, 4) hladilo po Allihnu.

Taj se oblik odvajanja koristi za komponente koje su lako hlapljive. Biljni uzorak koji sadrži eterično ulje u kontaktu je s vodom koja se zagrijava pri atmosferskom tlaku do temperature isparavanja. Vodene pare nose hlapljive komponente uzorka, koje se prolaskom kroz hladilo hlade i kondenziraju, a hlapljive se komponente eteričnog ulja hvataju u takozvanu „klopku“

organskih otapala. Nedostatak te metode je nastanak spojeva koji izvorno ne postoje u eteričnom ulju, tzv. artefakata, već nastaju naknadnom hidrolizom u postupku destilacije. Unatoč tome ta je metoda izolacije jednostavna, brza i često se koristi za dobivanje eteričnog ulja u laboratorijima.[172, 173]

U standardnoj aparaturi za destilaciju organsko se otapalo destilira, kondenzira i vraća na neprekinut prolaz kroz vodeni sloj. Jedna od standardnih aparatura za destilaciju eteričnog ulja je aparatura po Claevengeru prikazanog na **slici 2. 36**.

2.3.6. Metode određivanja kemijskog sastava eteričnih ulja

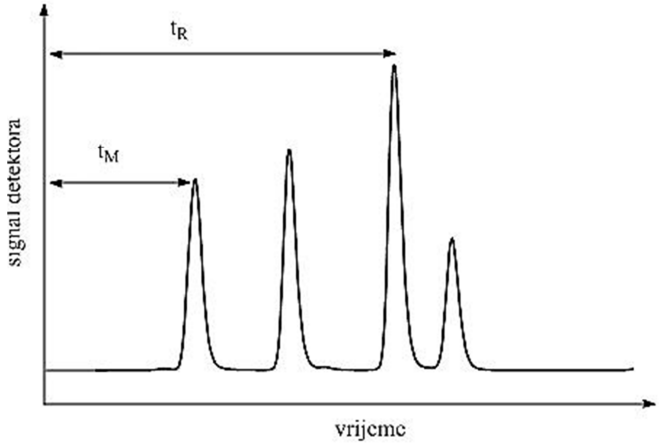
2.3.6.1. ***Kromatografija***

Eterična ulja su smjese organskih spojeva koje se razdvajaju, a u sastavu mogu imati različite funkcionalne skupine, zbog čega je ponekad prije njihove analize potrebna njihova obrada, a s ciljem njihove lakše i bolje analize i identifikacije. U svrhu analize i identifikacije sastojaka smjese eteričnih ulja najčešće se koristi vezani sustav plinska kromatografija - masena spektrometrija (engl. *gas chromatography/mass spectrometry*; GC/MS)

Kromatografske tehnike služe prije svega za odjeljivanje, a ponekad se koriste i za identifikaciju i kvantitativno određivanje pojedinih sastojaka u smjesama. Svim kromatografskim tehnikama zajedničko je postojanje stacionarne i mobilne faze. Prilikom analiza dolazi do odjeljivanja sastojaka na temelju njihove različite brzine kretanja kroz mobilnu fazu, koja može biti plinovita ili tekuća, te na temelju različita afiniteta vezanja sastojaka smjese za stacionarnu fazu. Sposobnost odjeljivanja sastojaka smjese ovisi o brzinama istjecanja sastojaka izkromatografske kolone. Te se brzine mogu odrediti i predstavljaju omjer raspodjele u kromatografiji. Vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (Rt) označava vrijeme koje je komponenti iz smjese potrebno da stigne do detektora nakon što je nanesena na kolonu.[171]

Kromatogram je ispis bilo koje funkcije koncentracije tvari koju smo analizirali, ovisan o vremenu ili volumenu elucije, tj. ispiranja (**slika 2.37**). Ukoliko na izlaz iz kolone postavimo

detektor, možemo dobiti podatke o ovisnosti koncentracije uzorka o vremenu ili volumenu dodane faze. Kromatogram je koristan za kvantitativnu i kvalitativnu analizu proučavane smjese i položaj pika na grafu može poslužiti za identifikaciju i kvantificiranje sastojaka.[171]



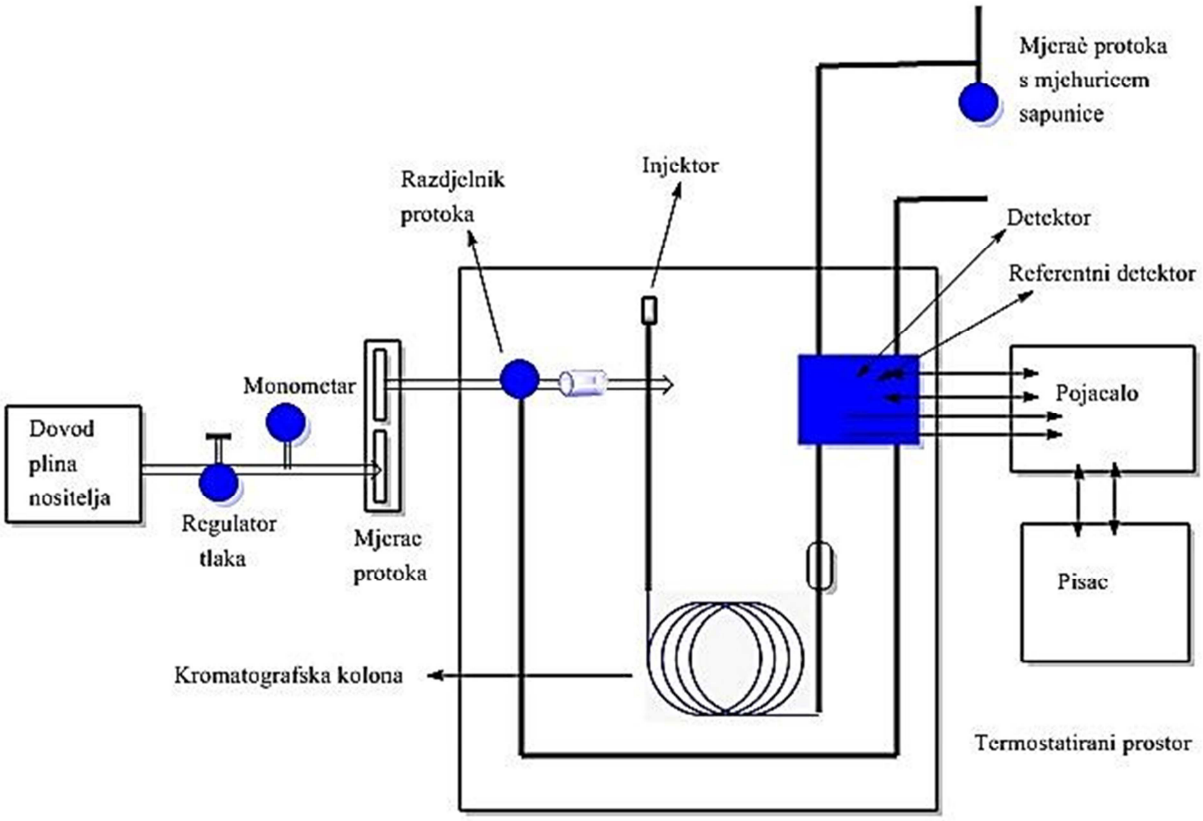
Slika 2.37. Tipični kromatogram smjese koja sadrži dva sastojka: t_M je vrijeme zadržavanja pokretne faze, t_R je vrijeme zadržavanja kemijskog spoja u smjesi

Odjeljivanje kromatografijom može se optimizirati tako da promijenimo neke od eksperimentalnih uvjeta, čime postižemo brže i efikasnije odjeljivanje. Optimiziranje se postiže mijenjanjem brzina gibanja sastojaka i smanjenjem širenja zona ispranog sastojka.[171]

Kromatografske analize mogu biti kvalitativne i kvantitativne. Kod kvalitativne utvrđujemo o kojim se spojevima radi u sastavu smjese, gdje kromatografija nudi samo jedan podatak o pojedinačnom spoju, a to je vrijeme zadržavanja na koloni. Stoga je za smjese nepoznata sastava potrebno imati na GC povezan i maseni spektrometar kako bi se precizno identificirao kemijski spoj. Kvantitativne vrijednosti u kromatografiji odnose se na visinu pika ili površinu ispod pika, čime se može utvrditi sadržaj pojedinog spoja u smjesi. Kvantitativno određivanje može uključivati i korištenje standarda, spoja poznate mase i retencijskog vremena, čime se postiže kvantifikacija sastojaka smjese.[171]

Plinska kromatografija je kromatografija na stupcu kod koje je mobilna faza plin, dok je stacionarna faza čvrsta tvar ili tekućina. Kod plinske adsorpcijske kromatofrafije čvrsta tvar je velike specifične površine, na kojoj se adsorbiraju analizirani sastojci. Sastojci uzorka se odjeljuju zbog razlika u položaju ravnoteže koja se uspostavlja između plinovitog sastojka

uzorka i čvrste površine stacionarne faze. U slučaju kad je stacionarna faza tekućina, nanesena je na površinu čvrstog nosača adsorpcijom ili kemijskim vezanjem (**slika 2.38**).[171]



Slika 2.38. Shema plinskog kromatografa

Helij, inertni plin, najčešće je upotrebljavana mobilna faza u plinskoj kromatografiji, a izbor plina ovisi o detektoru koji se koristi. Stacionarna faza u plinskoj adsorpcijskoj kromatografiji čvrsta je tvar velike specifične površine, na kojoj se adsorbiraju kemijski spojevi iz smjese. Pri dovodu plina postavljaju se regulatori tlaka, ventili, mjerači protoka kao i molekularna sita, koja služe za uklanjanje vode i nečistoća, a brzina protoka nadzire se regulatorima tlaka.[171]

Plinska kromatografija koristi se u analizi smjesa hlapljivih spojeva, kakva su i eterična ulja. Uzorak se unosi u kromatograf pomoću mikroštrcaljke na vrh kolone, koja se grije na temperaturi višoj od temperature isparavanja najmanje hlapljive komponente u smjesi. Volumen injektiranog uzorka obično iznosi nekoliko desetina mikrolitara.[171]

Za precizan rad kolone potrebno je da ona radi u izotermnim uvjetima, gdje su odstupanja u temperaturi u granicama nekoliko desetinki stupnja. Detektori u plinskoj kromatografiji moraju imati brzi odziv na male promjene koncentracije.[171]

Povezane ili spregnute tehnike povezuju sposobnost odjeljivanja pomoću kromatografije i kvalitativnog i kvantitativnog određivanja smjese spojeva. Plinska se kromatografija tako često povezuje sa spektroskopijom, čime dobivamo velike mogućnosti u smislu odjeljivanja, identifikacije i kvantifikacije sastojaka smjese.[171]

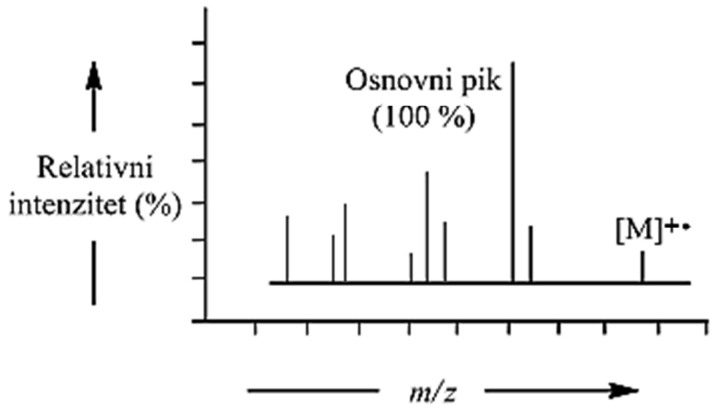
Osim masenog spektrometra (MS) na GC može biti povezan i drugi oblik detektora poput detektora termalne provodljivosti (engl: *thermal conductivity detector*, TCD); detektora s plamenim ionizatorom (engl. *flame ionization detector*, FID); fotoionizacijskoga detektora (engl. *photoionization detector*, PID); detektora koji radi na principu hvatanja elektrona (engl. *electron capture detector*, ECD); detektora atomske emisije (engl. *atomic emission detector*, AED) i infracrvenog spektroskopa (engl. *Fourier transform infrared spectrosopy*, FTIR). [171]

2.3.6.2. ***Spektrometrija masa***

Spektrometrija masa je analitička metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a potom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi i naboju. Ovom metodom određuju se relativne molekulske mase, molekulske formule, a mogu se dobiti i podaci o strukturi molekule. Postupak uključuje dva procesa, a to su ionizacija te potom razdvajanje i određivanje iona.[174]

Molekula uzorka u plinovitom stanju bombardira se, što je ključno, pri visokom vakuumu, snopom elektrona visoke energije, pri čemu se iz te molekule izbacuju elektroni. Nastaju pozitivni molekulski kationi (M+), koji se češće koriste u analizama nego što se koristi nastajanje negativnih iona. Molekularni su ioni visoko aktivirani, imaju višak energije, koja dovodi do kidanja veza unutar molekule, te dolazi do fragmentiranja u manje ione, čijom analizom možemo doći do informacija o strukturi proučavane molekule. Osim bombardiranja elektronima postoji još i kemijska ionizacija i bombardiranje brzim atomima.[174]

Razdvajanje i određivanje iona vrši se pomoću instrumenata s magnetskim sektorom ili u današnje vrijeme kvadrupolnim analizatorom masa. Ioni nastali ionizacijom ubrzavaju se u magnetskom dijelu instrumenta, prolaze kroz magnetsko polje i dobivaju otklon u magnetskom polju upravo razmjeran njihovoj brzini, naboju i masi. Ukoliko pojednostavnimo prikaz i kažemo da svi ioni imaju jednak naboj i jednaku brzinu, možemo reći da će otklon u magnetskom polju biti obrnuto proporcionalan masi fragmenata molekule.[174]



Slika 2.39. Maseni spektar

Spektrometar masa s magnetskim sektorom u analizatoru masa snima i prikazuje omjer mase (m) i naboja (z) s obzirom na relativan intenzitet pojedinog fragmenta (**slika 2.39**). Najviši i najintenzivniji signal naziva se osnovni signal i predstavlja standard, kojemu se dogovorno pripisuje vrijednost intenziteta 100. Prema standardu se određuju udjeli drugih fragmenata te molekule.[174]

Nakon što prođu kroz analizator masa, ioni ulaze u sakupljač, gdje se određuju te se putem električnog multiplikatora zabilježeni signal pojačava i bilježi na detektoru. Podaci se prikazuju u obliku elektroničkog signala na kompjuteru kao maseni spektar za proučavanu molekulu. Maseni spektar prikazuje intenzitet količine iona u ovisnosti o vrsti kationa m/e i karakterističan je za pojedinu molekulu.[174]

Kod identifikacije nepoznatog spoja masenom spektrometrijom koristi se usporedba dobivenih podataka s poznatim standardima i spojevima unutar postojećih velikih baza podataka. Iz spektra masa i elementarne analize možemo doznati molekulsku formulu i

relativnu molekulsku masu, a možemo pretpostaviti i broj i vrstu funkcionalnih skupina. Zbog svoje visoke osjetljivosti i brojnih podataka koje daje o pojedinačnom spoju, masena spektrometrija vrlo je moćna i često korištena metoda u identifikaciji komponenti smjese, pa tako i sastava eteričnog ulja.

2.3.6.3. ***Vezani sustav plinski kromatograf - maseni spektrometar (GC/MS)***

Vezani sustav plinski kromatograf i maseni spektrometar (GC/MS) predstavlja vrlo moćnu tehniku za razdvajanje i identifikaciju komponenti smjese kakva su i eterična ulja. Plinski kromatograf služi za razdvajanje sastojaka smjese, a spektrometar masa za identifikaciju pojedinog sastojka. Uređaj radi s vrlo malim količinama uzorka i može identificirati vrlo niske količine sastojka smjese, i to 10^{-12}–10^{-15}g sastojka u smjesi. Uzorak se u GC/MS unosi mikroštrcaljkom kao vrući upareni uzorak ili kao hladan, ohlađen uzorak na početak kolone. Cilj je unijeti što prije i što manju odgovarajuću količinu uzorka.[175]

2.3.6.4. ***Spektroskopija i spektrofotometrija***

Pojam spektroskopija odnosi se na analitičke metode koje proučavaju međudjelovanje elektromagnetskog zračenja i tvari koju proučavamo. Svaka tvar ima sposobnost apsorpcije, transmisije ili refleksije elektromagnetskog zračenja u širokom spektru valnih duljina. Spektroskopijom se mjeri sposobnost proučavane tvari da apsorbira, reflektira ili emitira zračenje. Spektroskopija koristi instrumente koji rade s različitim spektrom elektromagnetskog zračenja i analiziraju svojstva molekule te njezinu interakciju sa zračenjem. Vidljivi dio spektra elektromagnetskog zračenja nazivamo svjetlom, a instrumente koji se koriste u spektroskopiji često zajedničkim imenom zovemo optički instrumenti iako ne proučavaju samo vidljivi dio spektra.[171, 174]

Elektromagnetsko zračenje opisuje se pomoću frekvencije (υ) i valne duljine (λ) Brzina svjetlosti (c) dovodi u vezu ta dva pojma, pa se energija zračenja izražava kao:

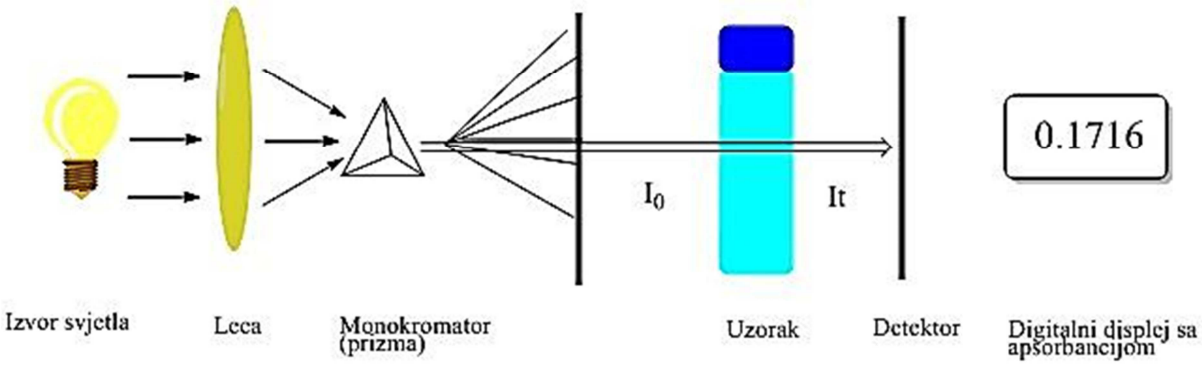
$$E = h\upsilon = h\,(c/\lambda)$$

iz čega slijedi da energija zračenja ovisi o frekvenciji i valnoj duljini na način da se zračenje povećava porastom frekvencije, a smanjuje porastom valne duljine. Pregled koji prikazuje odnose vrijednosti frekvencija i valnih duljina nazivamo elektromagnetskim spektrom i on je

podijeljen u područja prema njihovoj primjeni u spektroskopiji. Vidljivi dio spektra je područje zračenja na koje je osjetljivo ljudsko oko, obuhvaća valne duljine od 400 do 800 nm i predstavlja mali dio cijelog spektra. Osim vidljivog spektra postoji još i infracrveni (IR), s većim valnim duljinama i nižom energijom zračenja, zatim ultraljubičasti (UV), s nižim valnim duljinama i višim energijom zračenja, zatim područje radiovalova koje se koristi u nuklearnoj magnetskoj rezonanci (NMR) i ima nižu energiju od vidljivog i IR-zračenja, te X-zračenje, koje ima niske valne duljine i jako visoku energiju zračenja.[174]

Prolaskom elektromagnetskog zračenja kroz neku molekulu dolazi do apsorpcije ili propuštanja, emisije zraka, što ovisi o strukturi tvari kroz koju to zračenje prolazi kao i o njegovoj frekvenciji. Energija elektromagnetskog zračenja može apsorpcijom dati energiju molekuli koja je apsorbira. Tako naprimjer organski spojevi apsorbiraju energiju u UV i vidljivom dijelu spektra, a valne duljine pri kojima dolazi do apsorpcije ovise o jakosti veza unutar molekule.[174]

Osnovni dijelovi analitičkih instrumenata za sve oblike spektroskopije, poput emisijske, apsorpcijske i fluorescencijske, međusobno slični su i u funkciji i u izvedbi, pa se stoga zajedničkim imenom nazivaju optički instrumenti.



Slika 2.40. Spektrofotometar

Spektroskopski uređaji građeni su od pet osnovnih dijelova, koji uključuju stabilni izvor energije zračenja, poput zagrijane površine, plamena, iskre ili električnog luka, zatim selektora valnih duljina, koji omogućuje izdvajanje dijela spektra koji nam je potreban, a nazivamo ga još i monokromator (**slika 2.40**). Uređaj ima i jedan ili više spremnika za uzorke,

detektor zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljiv signal poput električnog te procesor signala i uređaja za njegovo očitanje. Kod emisijskih uređaja izvor svjetla i uzorak nalaze se zajedno, dok se kod apsorpcijskih i fluoroscencijskih uređaja uzorak i izvor svjetla nalaze na udaljenosti jedan od drugoga. Navedeni dijelovi mogu biti sklopljeni na različite načine s obzirom na primjenu i ekonomičnost korištenja instrumenta.[174]

U spektrofotometrijskim mjerenjima koristimo dva osnovna termina kojima opisujemo svojstva proučavane tvari, a to su transmitacija (T) i apsorbancija (A).

Transmitacija označava količinu neapsorbiranog zračenja, a izračunava se prema izrazu:

$$T = P/P_o$$

gdje se u odnos stavljaju upadno zračenje (P) i zračenje koje je prošlo kroz otopinu (P_o). Apsorbancija je funkcija količine svjetla i koncentracije tvari koja apsorbira elektromagnetsko zračenje i to je veličina bez dimenzije te se izražava kao negativni logaritam od transmitacije:

$$A = - \log 10\ T = - \log (P / P0) = \log (P0 / P).$$

Te je fizikalne veličine moguće opisati Lambert–Beerovim zakonom, koji stavlja u funkcijski odnos kvantitetu apsorpcije i koncentraciju vrste koja apsorbira elektromagnetsko zračenje prema jednadžbi:

$$A = \log (P0 / P) = a \cdot b \cdot c$$

gdje „a“ označava apsorptivnost i predstavlja apsorpcijski koeficijent, „b“ je širina apsorpcijskog medija, a „c“ koncentracija apsorbirajuće vrste.

Budući da u laboratorijskim mjerenjima dolazi do pogreške u izražavanju apsorbancije i transmitacije zbog interakcije svjetla s posudicama u kojima se nalazi uzorak, potrebno je izvršiti korekciju formule kojom se izražava apsorbancija. Zbog navedenog se uspoređuje snaga snopa koji je propušten kroz mjernu posudicu s otopinom koju mjerimo i snaga snopa u istoj posudici s otapalom. Ta je korekcija u skladu s Lambert–Beerovim zakonom i definira se jednadžbom:

$$A = \log (P_{otapalo} / P_{otopina})$$

Spektrofotometar je često korišten spektroskopski uređaj koji mjeri intenzitet svjetla nakon što svjetlo prođe kroz uzorak. Kvantitativno mjeri količinu svjetla koje kemijska molekula apsorbira, emitira ili reflektira, mjereći intenzitet svjetla koje prolazi kroz uzorak smjese. Može mjeriti intenzitet kao funkciju boje ili valne duljine. Uz pomoć spektrofotometra moguće je odrediti koncentraciju proučavane smjese.[171]

Spektrofotometar se sastoji od izvora zračenja, monokromatora ili selektora valnih duljina, dva spremnika – jedan za uzorak, drugi za slijepu probu – te detektora zračenja i uređaja za očitavanje rezultata mjerenja. Kontinuirani izvor svjetla može biti vodikova ili deuterijeva lampa, gdje električni luk nastaje električnim pobuđivanjem deuterija ili vodika pri niskom tlaku između niti žarulje premazane oksidom i metalne elektrode. Deuterijeva i vodikova žarulja proizvode kontinuirani spektar u području od 160 do 375 nm, pri čemu je intenzitet deuterijeve žarulje veći od vodikove, zbog čega se i češće koristi.[171]

Svjetlost iz lampe prolazi kroz uređaj koji sužava mjereno zračenje na usku vrpcu koju uzorak apsorbira ili emitira. Postoje dva osnovna tipa selektora za stvaranje uskih vrpca, a to su monokromator i filtri. Monokromator se najčešće koristi u spektrofotometriji. On propušta određenu valnu duljinu svjetlosti iz kontinuiranog spektra kroz pukotinu učvršćenu u žarišnoj ravnini. Svjetlost prolazi kroz proučavanu smjesu i nakon prolaska kroz tvar mjeri se intenzitet svjetla pomoću fotodiode ili drugoga svjetlosnog senzora te signal pretvara u kvantitativni oblik uz pomoć fotopretvornika signala. Spremnici za uzorke i slijepu probu zovu se kivete. Trebaju biti prozirni i izrađuju se od različitih materijala koji propuštaju određen raspon valnih duljina. Obično silikatno staklo rabi se u uređajima za primjenu u vidljivom spektru, između 375 i 2000 nm. Taljeni silicijev dioksid i kvarc koriste se iznad 3000 nm i ispod 350 nm.[171]

2.3.7. Metode za određivanje biološke aktivnosti eteričnog ulja

Biološku aktivnosti prirodnog spoja koji proučavamo možemo promatrati kroz aspekt njegova djelovanja na hranu ili na živi organizam, najčešće na čovjeka. Kod biološkog djelovanja aktivnog spoja u hrani aktivna tvar zaustavlja ili usporava oksidaciju, čime štiti hranu od kvarenja. Kod biološkog djelovanja aktivnog spoja unutar ljudskog organizma govorimo o antioksidacijskom djelovanju ili usporavanju i umanjivanju posljedica oksidativnog stresa, zatim inhibicijskom djelovanju biološki aktivnih spojeva na ključne enzime unutar čovjekova organizma kao i antimikrobnom učinku biološki aktivnih spojeva iz eteričnih ulja na mikroorganizme kao uzročnike bolesti kod ljudi i higijenskih promjena na hrani.[22,148]

2.3.7.1. ***Metode određivanja antioksidacijskog potencijala***

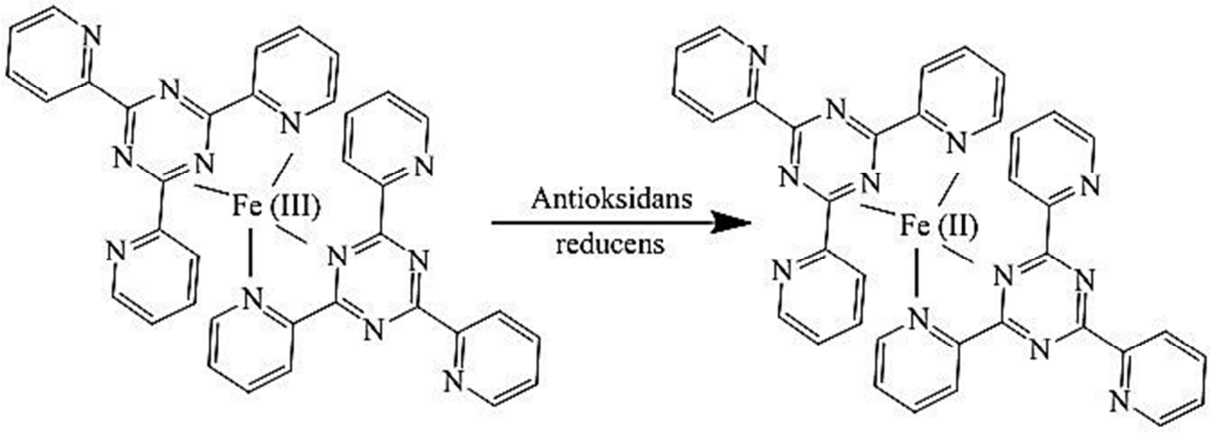
Antioksidacijska aktivnost nekog biološki aktivnog spoja ne može se mjeriti direktno, već se mjeri posljedica antioksidacijskog učinka toga biološki aktivnog spoja. Metode kojima se mjeri antioksidacijska aktivnost raznolike su i brojne. Kod razmatranja koju ćemo metodu koristiti za određivanje antioksidacijske aktivnosti biološki aktivnih spojeva valja voditi računa o izvoru reaktivnih spojeva i ciljanom supstratu. Osim promjene uvjeta, poput pH, temperature i koncentracije supstrata, na antioksidacijski kapacitet nekog biološki aktivnog spoja utjecat će izbor metode i medij u kojem se metoda testira. Stoga je u mjerenja antioksidacijskog potencijala potrebno uključiti i neke poznato dobre antioksidanse kako bi se dobiveni rezultati mogli usporediti.[148]

Metode koje mjere antioksidacijski potencijal prirodnih spojeva često se dijele na dvije skupine:
- metode kojima se mjeri sposobnost hvatanja slobodnih radikala
- metode kojima se mjeri sposobnost inhibicije oksidacijskog procesa.[148,176]

U ovom doktorskom radu korištene su mjerenja redukcijskog potencijala antioksidansa (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power* – FRAP) i metoda koja uključuje mjerenje sposobnosti uklanjanja slobodnog radikala difenilpikrilhidrazil (engl. 2,*2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*; DPPH) iz smjese. [26, 148, 177]

2.3.7.1.1. FRAP-metoda

FRAP-metoda je jednostavna spektrofotometrijska metoda u kojoj se mjeri redukcijski potencijal ispitivanog antioksidansa. Antioksidans je u ovom slučaju reducens koji sudjeluje u redoks-reakciji i oduzima elektrone željezu koje se nalazi u reakcijskoj smjesi. Reakcija se odvija pri niskom pH, prilikom čega Fe-ion u sastavu soli $Fe_{(III)}(TPTZ)_2Cl_3$, (2,4,6-tripiridil-s-triazin, TPTZ) u prisutnosti antioksidansa prelazi iz trovalentnog u dvovalentni oblik. Pritom dolazi do promjene obojenja iz blago žutog u plavo, čiji se intenzitet mjeri kod λ_{593} (**slika 2.41**).[177]



Slika 2.41. Strukturni prikaz promjena TPTZ-a u FRAP-metodi

Intenzitet plavog obojenja uspoređuje se s poznatom količinom željezovih iona u otopini i time određuje redukcijski potencijalu prisutnog antioksidansa.

Reakciju možemo prikazati kako slijedi:

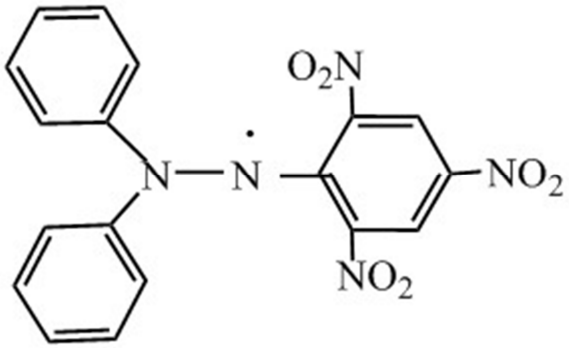
Fe^{3+}-TPTZ ----> Fe^{2+}-TPTZ

žuto obojenje plavo obojenje

Metodu su razvili Benzie i Strani (1996) kako bi mjerili redukcijski potencijal krvne plazme. Metoda se kasnije razvila i primjenjiva je za mjerenje i u drugim medijima, poput hrane, biljnih ekstrakata, sokova i vina.[148]

2.3.7.1.2. DPPH-metoda

DPPH-metoda jednostavna je spektrofotometrijska metoda koja određuje sposobnost antioksidansa da ukloni slobodni radikal koji se nalazi u reakcijskoj smjesi. Možemo reći da mjeri antiradikalnu efikasnost antioksidansa. Reakcija se temelji na hvatanju slobodnog radikala difenilpikrilhidrazil (DPPH) antioksidansom. Alkoholna otopina slobodnih radikala, koja je ljubičaste boje, djelovanjem antioksidansa pretvara se u neradikalni oblik, koji je žute boje i apsorbira na λ_{517} (**slika 2.42**).[175]



Slika 2.42. Slobodni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH•.

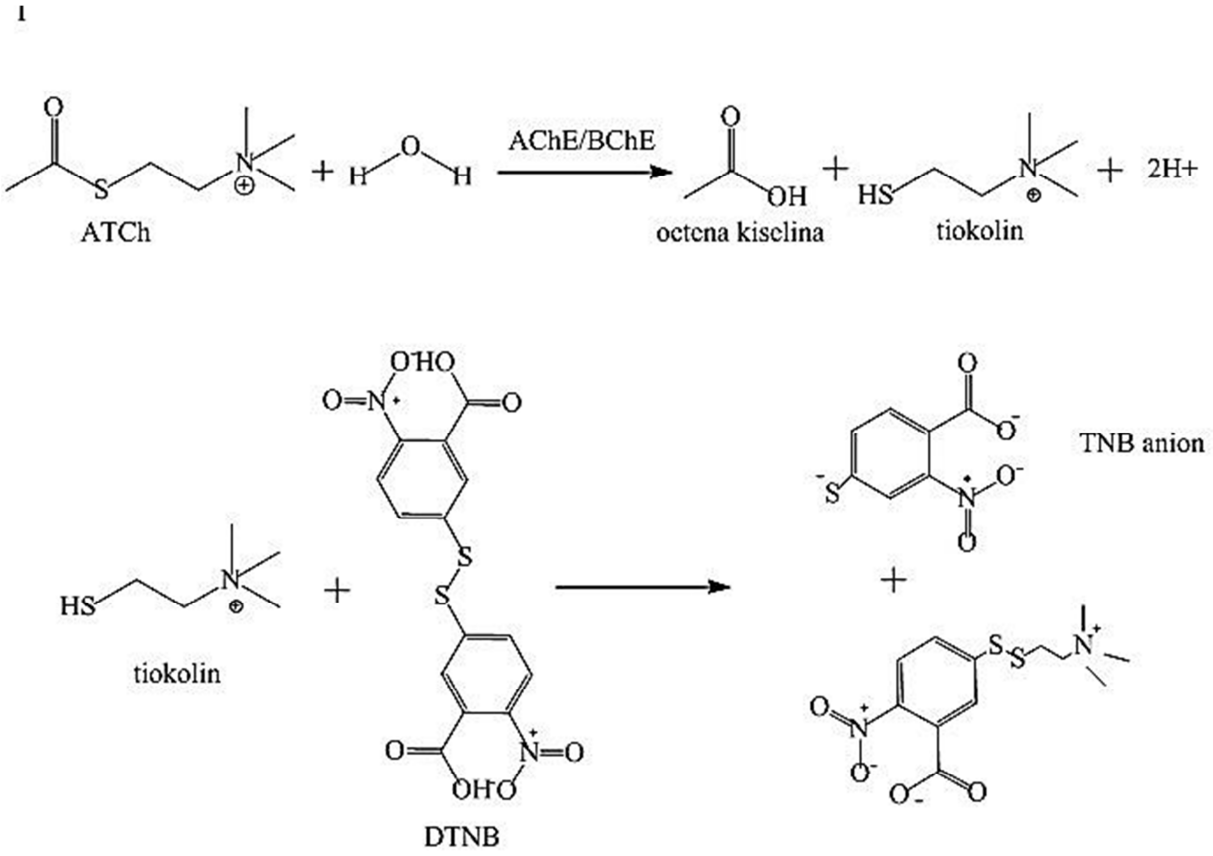
Slobodan se radikal DPPH• u reakciji s antioksidanskom prevodi u neradikalni oblik DPPH-H:

DPPH• + AH --> DPPH-H + A•

DPPH• + R• --> DPPH-R

2.3.7.2. ***Metode određivanja inhibicije kolinesteraza***

Za određivanje inhibicije kolinesteraza koristi se Ellmanova metoda (1961). Ona se temelji na hidrolizi acetiltiokolina (ATCh) uz pomoć enzima AChE ili BChE, pri čemu nastaje tiokolin (TCh). On dalje reagira s tiolnim reagensom DTNB-om, pri čemu nastaje anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB-), koji daje žuto obojenje, čija se promjena intenziteta mjeri spektrofotometrijski kod λ_{412} (**slika 2.43**).[32]



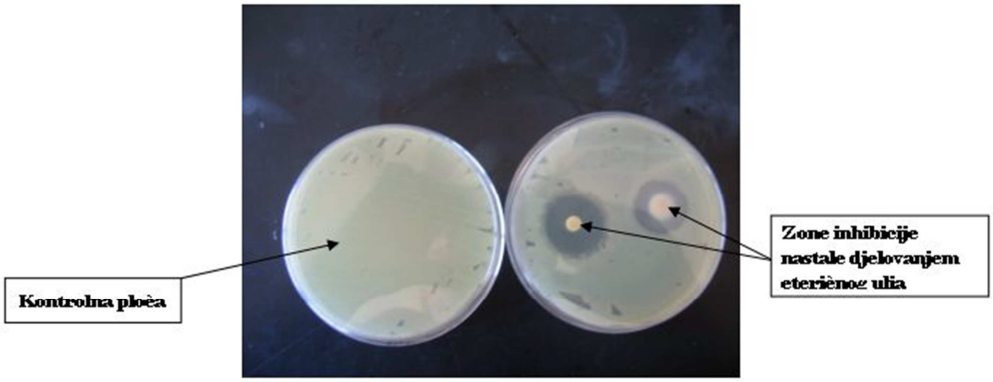
Slika 2.43. Reakcija na kojoj se bazira Ellmanova metoda

2.3.7.3. ***Metode određivanja antimikrobnog učinka***

Jedinstvena metoda za određivanje antimikrobnog učinka eteričnih ulja i biljnih ekstrakata ne postoji, pa se koriste neke od poznatih metoda. Najčešće se, zbog svoje jednostavnosti i brzine, u određivanju antimikrobnog učinka eteričnih ulja koriste dvije metode:

- metoda disk-difuzije, koja daje kvalitativne podatke
- metoda dilucije u tekućem mediju, koja daje kvantitativne podatke.

Metoda disk-difuzije temelji se na primjeni određene koncentracije antimikrobne tvari na papirnati disk koji se stavi na agar-podlogu s mikroorganizmom i inkubira. Nakon inkubacije i djelovanja antimikrobne tvari oko diska se pojave zone bez rasta mikroorganizma. Promjer zone inhibicije (ZI) ovisi o osjetljivosti mikroorganizma na proučavanu antimikrobnu tvar. Što je veći ZI, veća je osjetljivost mikroorganizma na proučavanu antimikrobnu tvar tvar (**slika 2.44**).



Slika 2.44. Metoda određivanja antimikrobnog učinka disk-difuzijom; preuzeto i prilagođeno iz [88]

Metoda dilucije u tekućem mediju može biti makrodilucijska i mikrodilucijska, ovisno o volumenu tekućeg medija u kojem se testiraju bakterije. Najčešće je korištena mikrodilucijska metoda, gdje se u mikrotitar pločicama s 96 jažica inokuliraju bakterijske kulture u volumenu od 0,1ml. Na isti bakterijski se soj tako istovremeno testira spektar serijskih razrjeđenja određenoga eteričnog ulja. Nakon inkubacije očita se vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), koja je definirana kao najniža koncentracija eteričnog ulja kod koje nema vidljivog zamućenja jažice, tj. vidljivoga bakterijskog rasta. Manji MIK znači bolji antimikrobni učinak testiranog ulja. Osim ZI- i MIK-vrijednosti ponekad se antimikrobna aktivnost izražava i kao minimalna baktericidna koncentracija (MBC).[88]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Za izradu ovoga doktorskog rada korištene su kemikalije analitičkog stupnja.

Od tvrtke *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka, korišteni su acetilkolinesteraza Tip V-S (E.C. 3.1.1.7, iz elektrofora električne jegulje); acetiltiokolin-jodid; butirilkolinesteraza (E. C. 3.1.1.8, iz konjskog seruma); butiriltiokolin-jodid; eserin 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; *Fast Blue B* sol (cinkova diazo-sol); naftil-acetat; 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) i takrin.

Od tvrtke *Merck*, Darmstadt, Njemačka, korištene su kemikalije: albumin frakcija V (iz goveđeg seruma); amonijev karbonat i TRIS-hidroksilaminometan.

Od tvrtke *Kemika*, Zagreb, Hrvatska, korišteni su: amonijev hidrogenkarbonat; bezvodni natrijev sulfat; EDTA; etanol 96%; etil-acetat dietileter; kalijev jodat; kloridna kiselina; ledena octena kiselina; malonska kiselina; manganov sulfat monohidrat; natrijev acetat trihidrat; pentan; petroleter (40–60 °C); sulfatna kiselina; škrob; vodikov peroksid; željezov(III) klorid heksahidrat i željezov(II) sulfat.

Od tvrtke *Alfa Aesar* (*A Johnson Matthey Company*) GmbH & Co., KG (Njemačka), korišten je pirogalol, 98%; a od tvrtke *T.T.T.* d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska) korištena je L(+)-askorbinska kiselina.

Od tvrtke *GRAM-MOL* d.o.o. (Zagreb, Hrvatska) korišteni su 96%-tni etanol i klorovodična kiselina. Za neke metode korištena je deionizirana voda.

3.2. Biljni materijal

Biljni materijal prikupljen je s prirodnih populacija u ljeto 2010. i 2013. godine na lokalitetima navedenim u **tablici 3.1**.

Tablica 3.1. Lokaliteti na kojima je sakupljen biljni materijal

Vrsta	Lokalitet (Broj populacije)	Herbarijska oznaka
C. ragusina L. (*Carduiformes*)	Marjan, Split	C_rag_2010
	otok Palagruža(1)	Cent_1/2013
	otok Vis(2)	Cent_2/2013
	Split, Marjan (19)	Cent_19/2013
C. solstitialis L. (*Dumulosae*)	Split, Marjan (17)	Cent_17/2013
C. rupestris L. (*Acrocentron*)	Kozjak, Malačka (6)	Cent_6/2013
	Kozjak, Malačka (7)	Cent_7/2013
	Kozjak, Malačka (8)	Cent_8/2013
	Vrdovo (9)	Cent_9/2013
	otok Krk (14)	Cent_14/2013
	otok Brač (26)	Cent_26/2013
	Muć (28)	Cent_28/2013
	otok Brač (29)	Cent_29/2013
	otok Brač (32)	Cent_32/2013

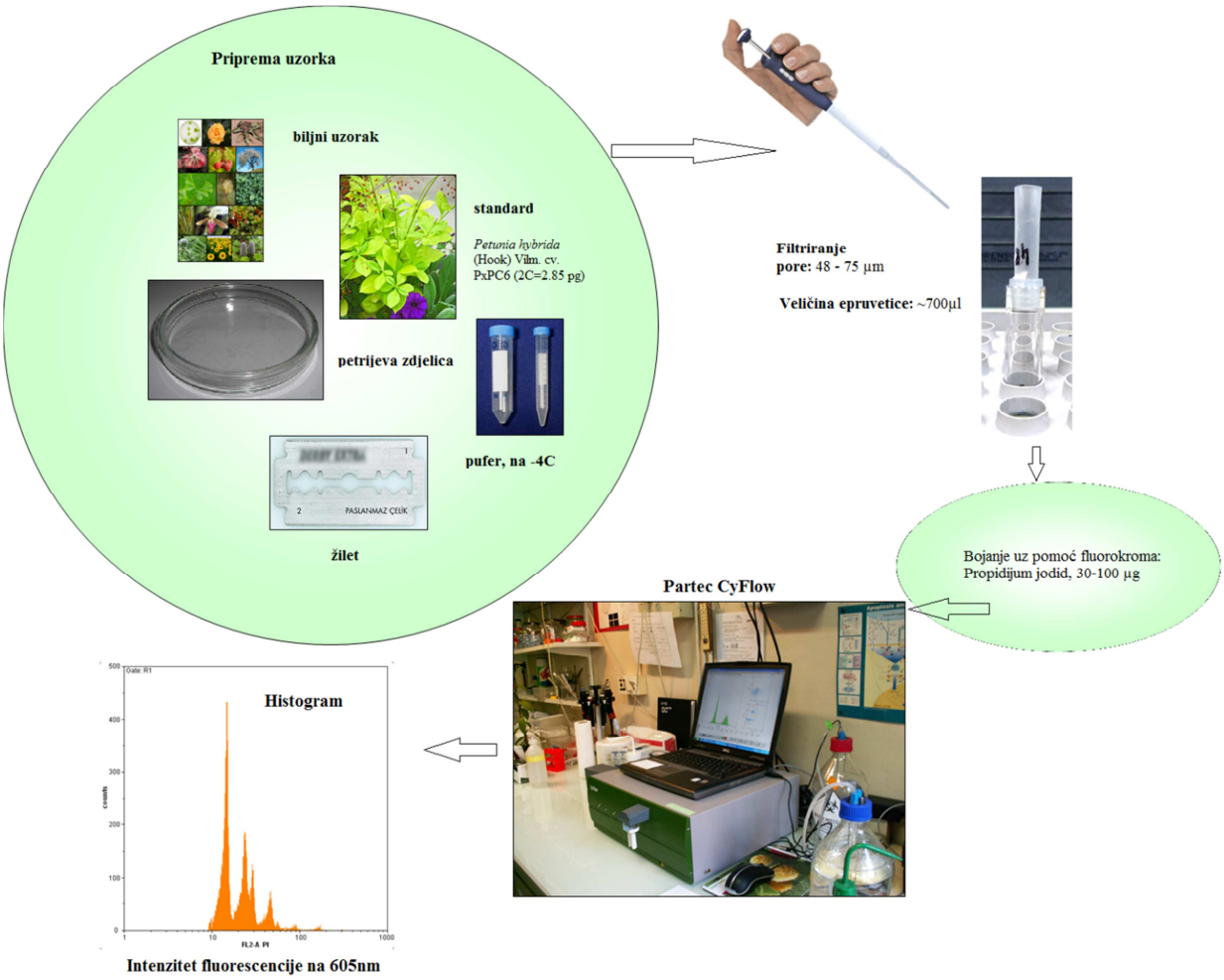
Sve biljne vrste određene su botaničkim metodama identifikacije putem morfologije, no konačna potvrda o autentičnosti vrsta dobivena je citogenetskim istraživanjima.

Listovi i sjemenke korištene su za citogenetska istraživanja, dok su vršni dijelovi prosušenih biljaka korišteni za ekstrakciju eteričnog ulja. Listovi za citometriju sabrani su s nekoliko jedinki iste vrste. Nakon branja listovi za citometriju skladišteni su u plastične vrećice sa silikagelom i pohranjeni u frižider do mjerenja. Sjemenke su pohranjene u papirnate vrećice te odijeljene od insekata kako bi ostale sačuvane.

Vršni dijelovi biljaka, uglavnom cvjetovi i listovi, nakon branja su prosušeni na sobnoj temperaturi i korišteni za ekstrakciju eteričnog ulja. Herbarski primjerci pohranjeni su u laboratoriju Zavodu za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta, pod brojevima navedenim u tablici 3.

3.3. Određivanje veličine genoma biljnog materijala protočnom citometrijom

Određivanje veličine genoma ili količine DNA rađeno je iz svježih listova *Centaurea* vrsta. Listovi ispitivanih jedinki isjeckani su oštrim žiletom zajedno sa standardom u Petrijevoj zdjelici i pomiješani u 600 µL hladnog Galbraithovog pufera i 1%-tnim polivinilpirolidinom 10,000 i 50 µg/mL RNAze A (*Sigma Chemical C. St. Luis*, SAD).[178]



Slika 3.1. Prikaz određivanja veličine genoma kod biljaka korištenjem protočne citometrije

Jezgre su filtrirane kroz najlonsko sito veličine pora od 50 µm u svrhu uklanjanja većih dijelova tkiva i tkivnih fragmenata. Bojanje je vršeno s propidijum-jodidom, koncentracije 50 µg/mL, pripremljenim otapanjem u destiliranoj vodi, filtriranim kroz 0,22 µl filter i čuvanim na -20 °C. Kao unutrašnji standard korištena je *Petunia hybrida* (Hook) Vilm. cv. PxPC6 (2C = 2,85 pg). Protočna citometrija rađena je na protočnom citometru *CyFlow SL3*, Partec,

Munster, Njemačka, sa zelenim laserom (532 nm 10 mW *Cobolt Samba Laser*) (**slika 3.1**). Najmanje 5 jedinki korišteno je za mjerenja kako bi se dobila srednja vrijednost količine DNA. Najmanje 5000 do 10000 jezgri analizirano je po pojedinačnom uzorku. 2C DNA-vrijednost izračunata je korištenjem linearne ovisnosti između poznatog standarda i fluorescentnog signala obojanih jezgri proučavane vrste. Apsolutna vrijednost izračunata je prema sljedećoj formuli, koju su zadali Doležel i Bartoš 2005:

$$\text{2C DNA} = \frac{\text{srednja vrijednost 2C pika uzorka}}{\text{srednja vrijednost 2C pika standarda}} \times \text{2C DNA standarda}$$

2C vrijednost (*DNA content*) od internog standarda (standard *Pisum sativum* 'Kleine Rheinländerin') iznosi 8.84 pg.[75]

3.4. Metoda određivanja broja i izgleda kromosoma u jezgri

Određivanje broja kromosoma, kariološka analiza, rađena je na stanicama korijenskih vršaka nastalih klijanjem sjemenki vrsta *Centaurea*. Vršci korjenčića pretretirani su s 0,002 M 8-hidroksikvinolinom kroz 3h na 16 °C, zatim fiksirani s 3:1 (v/v) etanol-octenom kiselinom na 4 ^{o}C kroz najmanje 24–48 h. Kromosomski preparati pripremljeni su tradicionalnim kariološkim metodama gnječenja s octenom karmin bojom nakon hidrolize od 12 min. s 1N HCl na 60 °C i bojanja Schiffovim reagensom.

Mikroskopska analiza kromosoma rađena je pomoću epifulorescentnog mikroskopa *Zeiss Axiophot*. Korištena je visokoosjetljiva CCD-kamera (*RETIGA 2000R; Princeton Instruments, Every*, France) i analizator slike (*Metavue, Every*, France). Broj kromosoma određen je proučavanjem metafaznih kromosoma od minimalno 20 sjemenki po populaciji.

3.5. Metode izolacije hlapljivih spojeva iz biljnog materijala

Eterično ulje iz proučavanih biljaka izolirano je hidrodestilacijom uz pomoć aparature tipa Claevenger (**slika 3.2**). U okruglu tikvicu dodano je oko 100 g prosušenog i grubo usitnjenog biljnog materijala i 1 litra destilirane vode zagrijane na temperaturu vrenja. Isparljive komponente eteričnog ulja zajedno s vodenim parama iz tikvice prolaze postraničnim cijevima aparature, kroz Leibigovo hladilo, hlade se i kondenziraju u hladilu izrađenom po Allihnu. U središnjoj cijevi ovog hladila nalazi se smjesa organskih otapala pentana i dietiletera u omjeru 1:3, tzv. „klopka“ ili „trap“. U tim organskim otapalima sastojci se ulja zadržavaju, dok voda pada na dno i reciklira se u tikvicu, gdje se nastavlja hidrodestilacija. Nakon 150 minuta hidrodestilacije smjesa eteričnog ulja i organskih otapala iz klopke u centralnoj cijevi prebaci se u suhu bočicu. Dodatkom bezvodnog natrijevog-sulfata, koji se ukloni dekantiranjem, uklonimo ostatke vode iz eteričnog ulja. Nakon sušenja smjesu prebacimo u suhu, izvaganu bočicu u kojoj ulje hermetički zatvoreno čuvamo u zamrzivaču na -20 ^{o}C do upotrebe za daljnje analize.

Slika 3.2 Aparatura po Clevengeru

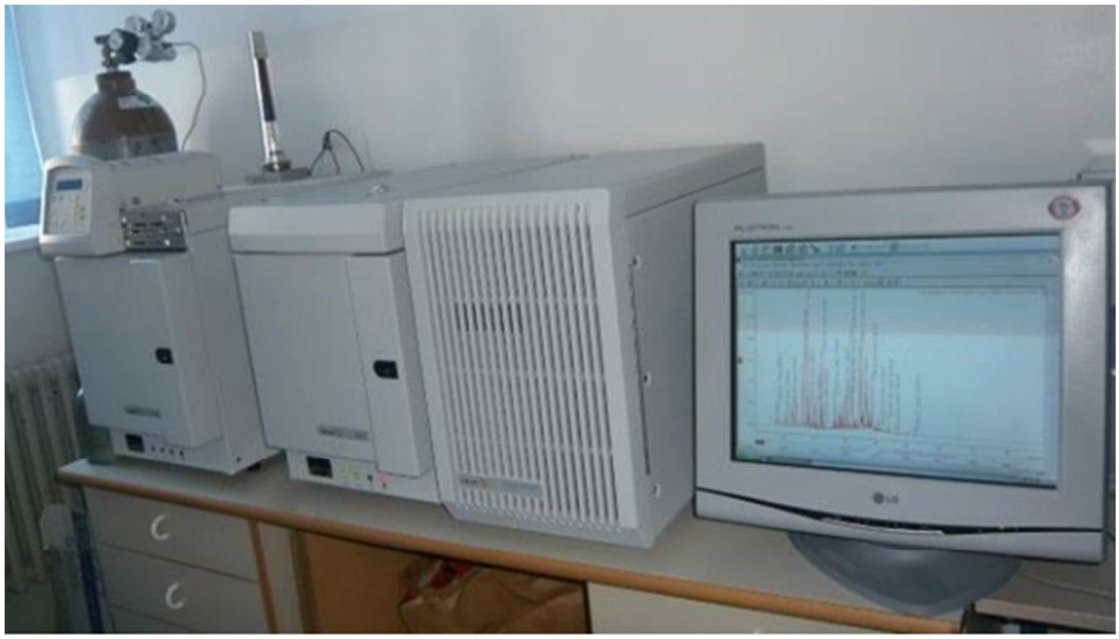
Za mjerenje biološke aktivnosti eteričnog ulja svako pojedinačno eterično ulje otopljeno je u etanolu i određena mu je početna masena koncentracija.

3.6. Metode analize hlapljivih spojeva iz eteričnih ulja vezanim sustavom plinska kromatografija - masena spektrometrija (GC/MS)

Kvalitativna i kvantitativna analiza eteričnih ulja napravljena je metodom plinske kromatografije te uz pomoć veznog sustava plinska kromatografija - masena spektrometrija (GC i GC/MS). Uređaj korišten za analize bio je *Varian Inc. Lake Forest* (CA, USA), plinski kromatograf (GC), model 3900, opremljenim detektorom masa, masenim spektrometrom (MS) model 2100T, te računalom (**slika 3.3**).

Za analize je korištena nepolarna kapilarna kolona VF-5MS dužine 30 m x 0,25 mm i debljine stacionarne faze 0,25 mm. Temperaturni program za VF-5MS-kolonu bio je kroz 3 minute izoterman na 60 ^{o}C, zatim se povisio na 246 ^{o}C stopom od 3 ^{o}C min.$^{-1}$ i zadržao izotermno kroz 25 min. na toj temperaturi.

Nosač plina bio je helij, sa stopom protoka 1 ml min.$^{-1}$, temperaturom injektora od 250 ^{o}C, injekcijskim volumenom od 1 μL, omjerom raspodjele od 1:20. Ionizacijska voltaža masenog spektrometra bila je 70 eV, raspon skeniranja masa: 40–350 masenih jedinica i temperatura izvora iona od 200 ^{o}C.



Slika 3.3. Vezni sustav plinski kromatograf maseni spektrometar (GC/MS)

Identifikacija kemijskih spojeva u sastavu eteričnog ulja temeljena je na usporedbi Kovačevih indeksa sa serijom alkana C_7-C_{40}, s literaturnim podacima za Kovačeve indekse u bazi NIST2002 (*National Institute od Standards and Technology*, Gaithersburg, MD, USA) i usporedbom masenih spektara spojeva iz baza podataka (*Wiley 7 Library* – Wiley, New York, NY, USA i NIST 2002).[163] Korištena je i interna biblioteka spojeva, nastala prethodnim analizama i usporedbom s čistim spojevima, analiziranim i korištenim u laboratoriju Zavoda za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta. Udio sastojaka u smjesi spojeva izračunat je kao srednja vrijednost površine GC-pikova.

3.7. Metode određivanja biološkog potencijala hlapljivih spojeva

3.7.1. Metode određivanja antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja

Za mjerenje antioksidacijske sposobnosti eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Centaurea* odabrane su dvije *in vitro* metode: FRAP-metoda i DPPH-metoda. U tu svrhu korišteni su čitač mikrotitarskih pločica „Sunrise“ (*Tecan GmbH*, Austrija) i *UV-Vis Perkin-Elmer Lambda EZ 201* spektrofotometar (**slika 3.4**).

Slika 3.4. Višekanalni spektrofotometarski čitač mikrotitarskih pločica „Sunrise“ (*Tecan GmbH*, Austria).

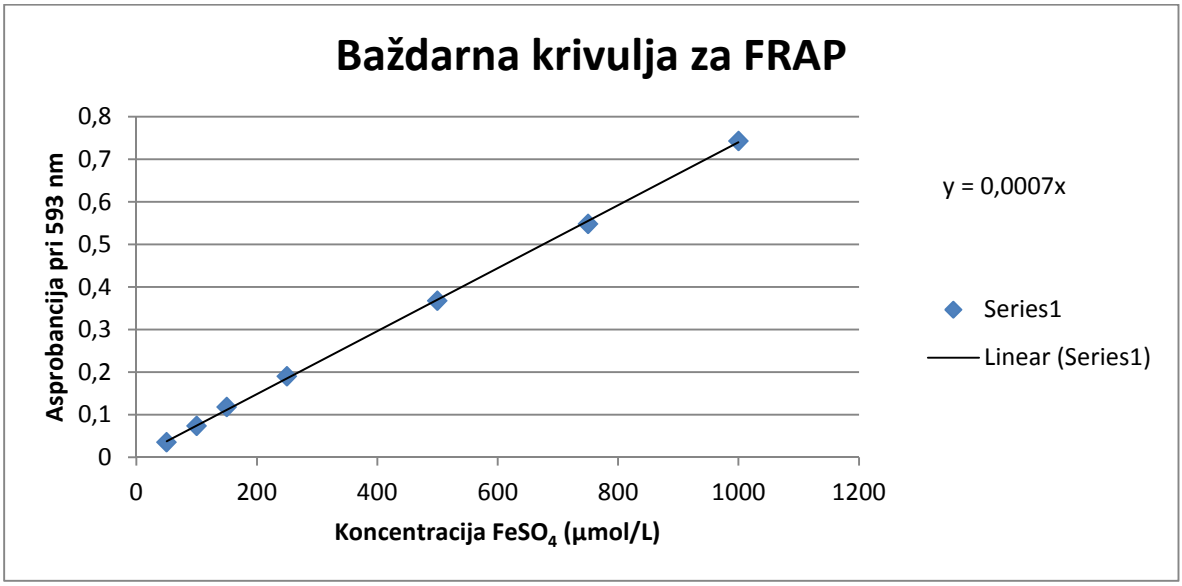
Svaki uzorak testiran je najmanje triput, početne osnovne koncentracije 1 g/L. Obrada rezultata i grafički prikazi rezultata izrađeni su pomoću odgovarajućih računalnih statističkih paketa *Microsoft Excel*.

FRAP-metoda

Redukcijski potencijal eteričnih ulja biljaka roda *Centaurea* određen je pomoću FRAP-metode (Benzie i Strain, 1996). Određivanje se temelji na reducirajućoj sposobnosti eteričnog ulja i njezinoj usporedbi s rezultatima dobivenim za mjerenje s poznatim koncentracijama Fe^{2+} iona (standardna krivulja) (**slika 3.5**).

Reakcijska smjesa sastojala se od 225 µL FRAP-reagensa, koji se dobije miješanjem 25 mL acetatnog pufera s 2,5 mL otopine TPTZ-reagensa i 2,5 mL otopine $FeCl_3$, u što je dodano 7,5 µL otopine uzorka eteričnog ulja.

Reagensi potrebni za pripremu FRAP-reagensa su 0,3 mol/L acetatnoga pufera pH = 3,6; 40 mmol/L klorovodične kiseline (HCl); 10 mmol/L otopine TPTZ u 40 mmol/L HCl i 20 mmol/L otopine $FeCl_3$.



Slika 3.5. Baždarna krivulja za FRAP

Svježe pripremljeni žuti FRAP-reagens ulije se u jažice mikrotitarske pločice, doda mu se uzorak s potencijalnim antioksidansom čiji redukcijski potencija želimo izmjeriti. Mjeri se intenzitet plavog obojenja kod λ_{592} u vremenu, t = 0, i početnu apsorbanciju označimo s A_0. Reagensu se nakon toga dodaje uzorak eteričnog ulja kao potencijalni antioksidans i mjeri se promjena apsorbancije koja se dogodi nakon 4 minute, označena s A_4. Da bismo dobili apsorbanciju čistog uzorka, oduzimamo apsorbanciju izmjerenu u četvrtoj minuti i apsorbanciju na početku (A_4 - A_0) i dobivenu vrijednost uspoređujemo s baždarnom krivuljom (**slika 3.5**). Otopina poznate koncentracije željezovih iona (Fe^{2+}) izražava se mmol/L ekvivalenata Fe^{2+}/L. Koncentracije otopine $FeCl_2$ korištene za izradu baždarne krivulje išle su od 0 do 1250 mmol/L. Otopine za izradu baždarne krivulje testiraju se istim gore navedenim postupkom. Krivulja je izrađena korištenjem računalnog paketa *Microsoft Office*, *Excel*.

DPPH-metoda

Antioksidacijski kapacitet uklanjanja slobodnog radikala DPPH• eteričnim uljem biljaka roda *Centaurea* određivan je spektrofotometrijskom DPPH-metodom (Brand Williams, 1995). Metoda je visoko reproducibilna i pogodna za rad s malim količinama uzorka. Mjerenje intenziteta žutog obojenja radi se pri λ_{517}. DPPH-radikal otopljen je u 96%-tnom etanolu, koji je korišten i za podešavanje nulte točke aparata. Reakcijska smjesa sastojala se od 1 mL DPPH-radikala koncentracije 0,04 g/L i 50 μL otopine uzorka eteričnog ulja u etanolu. Nakon 60 minuta očitana je apsorbancija reakcijskih smjesa i izračunat % inhibicije uklanjanja radikala DPPH• prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = ((A_0 - A_{uzorka})/A_0) \times 100$$

gdje A_0 predstavlja apsorbanciju otopine DPPH bez uzorka mjerene na početku, kada je vrijeme t = 0 min., a A_{uzorka} predstavlja apsorbanciju uzorka eteričnog ulja mjerenu nakon t = 60 min.

3.7.2. Metoda određivanja sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraze

Ellmanova metoda korištena je za određivanje sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraze. Mjerenje je rađeno na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica „Sunrise“ (*Tecan GmbH*, Austria (**slika 3.4**) pri valnoj duljini od 409 nm, s automatskim miješanjem i snimanjem podataka na računalo. Mjerenja su rađena na temperaturi od 25 °C uz acetiltiokolin (ATCh) kao supstrat i DTNB kao reagens. Intenzitet žuto obojenog produkta mjeren je kod λ_{409} budući da uređaj posjeduje filter koji propušta svjetlost navedene valne duljine, a koja je najbliža λ_{412}, propisanoj u metodi. Mjerenja aktivnosti kolinesteraze provedena su u uvjetima stalne količine supstrata.

Reakcijska smjesa sadržavala je 180 μL 0,1 mol/L fosfatnog pufera pH = 8; 10 μL 5,5'-ditio-bisa (2-nitrobenzojeve kiseline) – DTNB; 10 μL acetilkolinesteraze – AChE iz elektrofora električne jegulje; 10 μL acetiltiokolin-jodida – ATChI; i 10 μL uzoraka određene koncentracije otopljenog u etanolu ili samog etanola (kontrolno mjerenje). Ukupan volumen reakcijske smjese iznosio je 220 μL.

Koncentracija DTNB-a u smjesi iznosila je 0,3 mmol/L, a početna otopina pripremljena je u 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH = 7, s dodatkom 0,12 mol/L natrijevog-hidrogenkarbonata. DTNB je stabilniji ukoliko se otopi u piferu pH = 7, nego u puferu pH = 8.[32]

Koncentracija AChE u smjesi iznosila je 0,03 U/mL (1 U enzima hidrolizira 1 μmol supstrata u minuti pri pH = 8 i temperaturi od 37 °C). Koncentracija ATChI u smjesi iznosila je 0,5 mmol/L, a početne otopine za AChE i ATChI pripremljene su koristeći 0,1 mol/L fosfatni pufer pH = 8.

Mjerenja su provedena s po tri ponavljanja u trajanju od 6 min., a postotak inhibicije AChE eteričnim uljem računa se prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije AChE} = (((A_E - B_E) - (A_U - B_U))/(A_E - B_E)) \text{ X } 100$$

gdje je A_E oznaka za apsorbanciju otopine enzima bez uzorka/inhibitora, dok je B_E oznaka za slijepu probu otopine enzima u kojoj se ne nalazi supstrat; A_U je oznaka za apsorbanciju

otopine enzima s uzorkom/inhibitorom, a B_U oznaka za slijepu probu otopine enzima u kojoj se ne nalazi uzorak/inhibitor.

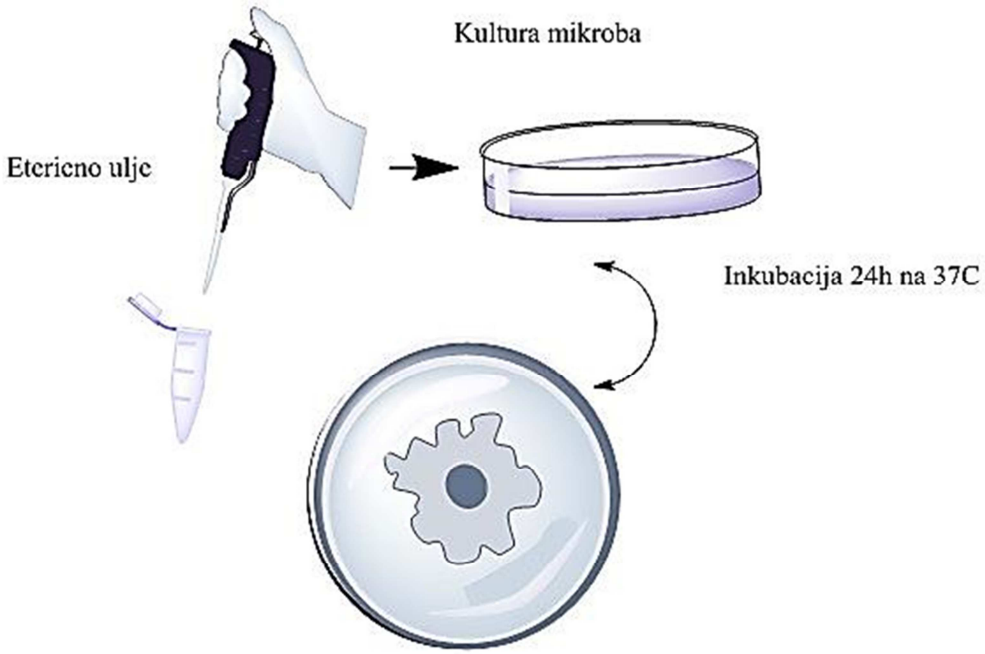
Kod određivanja inhibicijske sposobnosti eteričnih ulja na BChE kao supstrat se koristi sintetski butiriltiokolin-jodid (BTChI) koncentracije 0,5 mmol/L u smjesi i BChE iz konjskog seruma čija koncentracija u smjesi iznosi 0,03 U/mL. Početne otopine BTChI-a i BChE pripremljene su u 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH = 8. Ostali sastojci reakcijske smjese i mehanizam reakcije identični su kao kod testiranja AChE.

3.7.3. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja

Za određivanje antimikrobnog djelovanja eteričnog ulja biljaka roda *Centaurea* korištene su metoda disk-difuzije i metoda agar-dilucije. Određivanje antimikrobnog učinka rađeno je u Laboratoriju za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja vrste *C. ragusina* testirana je na širok panel patogenih mikroorganizama:

- Gram-pozitivne bakterije:
  - *Bacillus cereus* (soj ATCC 11778)
  - *Enterococcus faecalis* (soj ATCC 29212)
  - *Staphylococcus aureus* (soj ATCC 25923)
  - *Clostridium perfringens* (soj FNSST 4999)
- Gram-negativne bakterije:
  - *Escherichia coli* (soj FNSST 982)
  - *Klebsiella pneumoniae* (soj FNSST 011)
  - *Chronobacter sakazakii* (soj FNSST 062)
  - *Pseudomonas aeruginosa* (soj FNSST 014)
- gljivice:
  - *Penicillium funiculosum* (soj FNSST 3724)
  - *Saccharomyces cerevisiae* (soj FNSST 901)
  - *Candida albicans* (soj ATCC 10231).
  - *Aspergillus fumigatus* (soj FNSST 3833) [180]



Slika 3.6. Shematski prikaz testiranja antimikrobnog djelovanja

Metoda disk-dilucije koristi diskove od filter-papira promjera 6 mm, koji se postave na kruta hraništa na kojima su prethodno inokulirane čiste kulture bakterija i gljivica približne koncentracije 10^4–10^6/mL. Nasađivanje mikrobnih kultura rađeno je s 20 mL Mueller–Hintonovog hranjivog agara u Petrijevim zdjelicama promjera 11 cm. Na svako hranilište postavljena su po tri diska s po 5 µL uzorka eteričnog ulja i inkubirana 24 sata na 37 ^oC. Nakon inkubacije očitane su zone inhibicije rasta i izražene su u milimetrima. Uz uzorke su, u svrhu usporedbe, inkubirani i standardni antibiotici ili fungicidi (**slika 3.6**).

Volumen eteričnog ulja od 50 µL, nanesen na disk, odgovara koncentraciji 500 µg/disku. Za usporedbu učinkovitosti antimikrobnog djelovanja spomenutih eteričnih ulja sojevi mikrorganizama testirani su na anitbiotike koji se uobičajeno koriste u kliničkoj praksi za liječenje infekcija Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, poput ampicilina, gentamicina i cefotaksima, te na antimikotik amfotericin B. Ampicillin (Amp) korišten je u količini od 30 µg po disku; gentamicin (Gen) u količini od 15 µg po disku; cefotaksim (Cef) u količini od 30 µg po disku i poznato dobar antimikotik amfotericin B (Amf B) u količini od 10 µg po disku.

Metoda agar-dilucije u tekućem mediju koristi mikrotitarske pločice s 96 jažica, u koje se inokuliraju bakterijske kulture u volumenu od 0,1 ml. Na isti se bakterijski soj tako istovremeno testira spektar serijskih razrjeđenja određenog eteričnog ulja. U svaku se jažicu prvo dodaje 50 µl tekućeg Mueller-Hintonova medija (*Becton Dickenson*, USA) te u prvi stupac jažica eterično ulje određene koncentracije ukupnog volumena 100 µl. Zatim se 50 µl suspenzije iz prve jažice prebacuje u iduću te dobro resuspendira, iz te se jažice u iduću prebaci 50 µl suspenzije i tako se nastavi do posljednje jažice u nizu, stvarajući serijska razrjeđenja eteričnog ulja, pri čemu je u svakoj idućoj jažici koncentracija eteričnog ulja upola manja. Jedino se u posljednju jažicu ne stavlja eterično ulje, već samo Mueller-Hintonov medij jer služi kao kontrola. Nakon toga se 50 µl prekonoćne kulture bakterija u tekućem Mueller-Hintonovu mediju inokulira u svaku jažicu. Gustoća inokuluma mora biti 0,5 Mc Farlanda, što iznosi 1 x 106 CFU/ml za bakterije i 1 x 104 CFU/ml za gljivice.

Mikrotitar-pločice pokriju se sterilnom folijom ili poklopcem te inkubiraju 18 sati u termostatu na 37 ºC za bakterije te na 25 ºC za gljivice. Nakon inkubacije očita se vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK-a). MIK je definiran kao najniža koncentracija eteričnog ulja kod koje nema vidljiva zamućenja jažice, tj. vidljiva bakterijskog rasta. Što je manji MIK, bolja je antimikrobna aktivnost testiranog ulja.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Citogenetski profil biljaka roda *Centaurea*

Citogenetski profil odabranih biljaka roda *Centaurea* istraživanih u ovom doktorskom radu odnosi se na određivanje veličine genoma, korištenjem metode protočne citometrije, te broja i izgleda kromosoma, korištenjem standardnih kariooloških metoda.

Kriterij za izbor vrsta bio je način njihove rasprostranjenosti, pa je tako izabran stenoendem koji raste na vrlo ograničenom području – *Centaurea ragusina*, zatim endem šireg rasprostranjenja, kao što je *Centaurea rupestris* i kozmopolit, širom svijeta rasprostranjena vrsta *Centaurea solstitialis*, koja je ujedno i invazivna vrsta. Odabrane vrste sabrane su sa staništa gdje vladaju različiti ekološki uvjeti te s različitih nadmorskih visina. Citogenetski su proučavane vrste *Centaurea ragusina* s otoka Palagruže, Visa i s brda Marjan u Splitu, zatim *Centaurea solstitialis* s brda Marjan u Splitu i *Centaurea rupestris* s brda Kozjak, s dvaju lokaliteta na Malačkoj, iz mjesta Muć i Vrdovo te s otoka Brača i Krka. Izabrane vrste pripadaju i botanički taksonomski različitim sekcijama, pa je stoga zanimljivo proučiti sastav eteričnog ulja i s tog aspekta.

Vrste roda *Centaurea* dosad su dobro istražene u morfološkom smislu, a za velik dio vrsta poznat je i broj kromosoma, no kod malog broja vrsta istražena je veličina genoma i detaljan izgled kromosoma. Vrste roda *Centaurea* došle su u fokus istraživanja zbog svojih ljekovitih svojstava kao i zbog invazivnih vrsta koje pripadaju tom rodu, a uzrokuju štetu u poljoprivrednim nasadima.[47]

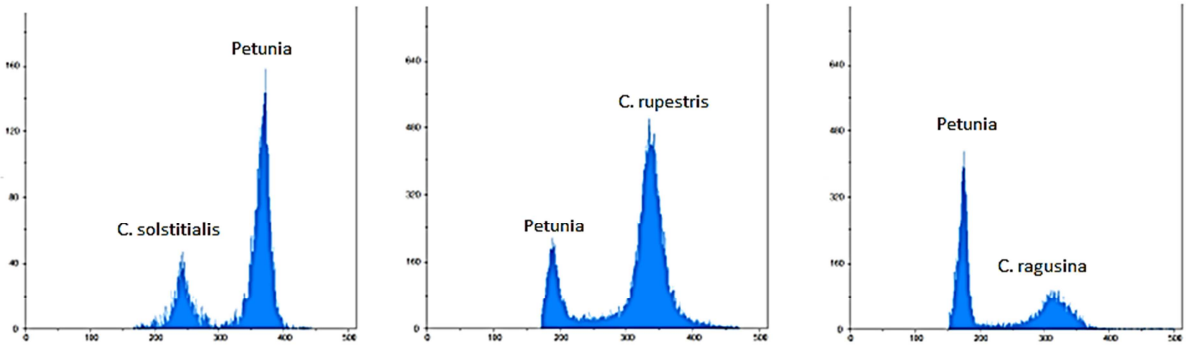
Kako bi prezentirani rezultati fitokemije bili nedvojbeno vezani za vrste koje smo istraživali, bilo je potrebno utvrditi autentičnost ispitivanoga biljnog materijala. Poznato je da morfološke razlike među vrstama mogu biti nedovoljno jasno definirane, te mogu dovesti do pogrešna botaničkog određivanja istraživane vrste. Stoga je, uz morfološku karakterizaciju istraživanih vrsta koju je napravio botaničar doc. dr. sc. Mirko Ruščić, sa Zavoda za biologiju

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, bilo potrebno napraviti i citogenetska istraživanja kako bi se sa sigurnošću potvrdila autentičnost istraživanih vrsta.

Citogenetski su proučavane vrste *Centaurea ragusina* s otoka Palagruže, otoka Visa i s brda Marjan u Splitu, *Centaurea solstitialis* s brda Marjan u Splitu; *Centaurea rupestris* s lokaliteta Malačka na brdu Kozjak, iz mjesta Muć i Vrdovo te s otoka Krka i Brača. Citogenetska istraživanja u ovom doktorskom radu vodila su se na većem broju populacija za sve tri spomenute vrste kako bi se utvrdilo da su dobiveni rezultati veličine genoma u skladu s botaničkom morfološkom determinacijom odabranih vrsta roda *Centaurea*.

Broj kromosoma i količina DNA u prijašnjim objavljenim istraživanjima određeni su za vrste *C. ragusina* ssp. *ragusinae* s otoka Mrkana i Hvara, te *C. ragusina* ssp. *lungensis* s Dugog Otoka kao i za *C. rupestris* s planine Biokovo.[1]

Vrsta *C. solstitialis* citogenetski dosad nije istražena u Republici Hrvatskoj.



Slika 4.1. Histogramski prikaz veličine genoma proučavanih vrsta roda *Centaurea*

Brojčane vrijednosti veličine genoma proučavanih vrsta ekstrapolirane su iz histogramskih prikaza rezultata protočne citometrije za proučavane vrsta roda *Centaurea* (**slika 4.1**).

Broj kromosoma za odabrane vrste roda *Centaurea*, veličina genoma izražena kao 2C DNA-vrijednost u pikogramima i kao 1Cx-vrijednost, tj. monoploidna veličina genoma, u megaparovima baza, s koeficijentom varijacije (CV) dobivenim u istraživanju u okviru ovoga doktorskog rada kao i literaturnim podacima za 2C-vrijednosti navedenih vrsta iz prethodno objavljenih istraživanja za proučavane vrste prikazani su u **tablici 4.1**.

Tablica 4.1. Broj kromosoma, sadržaj DNA u jezgri i prethodni podaci vrijednosti 2C DNA za proučavane vrste roda *Centaurea*.

Takson (Sekcija)	Lokalitet populacije (interna oznaka populacije)	2n	2C DNA u pg (SD)*	CV (%)**	1Cx u Mbp	Interni standard	**Prethodni podaci 2C u pg (SD)**
C. ragusina L. (*Carduiformes*)	otok Palagruža (1)	20	3,61(0,08)	2,01	1766	*Petunia*	**3,31(0,01)** **3,43(0,03)**[1]
	otok Vis (2)	20	3,34 (0,02)	0,68	1633	*Petunia*	
	Split, Marjan (19)	20	3,37 (0,03)	0,73	1648	*Petunia*	
C. rupestris L. (*Acrocentron*)	Kozjak, Malačka (6)	20	3,60 (0,09)	2,63	1760	*Solanum*	**2,33(0,04)** **3,50(0,02)** **3,53(0,06)**[1]
suhi listovi	Kozjak, Malačka (7)	20	3,54 (0,10)	2,91	1731	*Petunia*	
suhi listovi	Kozjak, Malačka (8)	20	3,59 (0,07)	1,92	1756	*Petunia*	
	Vrdovo (9)	20	3,64 (0,05)	1,40	1780	*Solanum*	
suhi listovi	otok Krk (14)	20	3,62 (0,08)	2,22	1770	*Solanum*	
	otok Brač (26)	20	3,48 (0,02)	0,60	1702	*Petunia*	
	Muć (28)	20	3,50 (0,02)	0,59	1712	*Petunia*	
	otok Brač (29)	20	3,43 (0,04)	1,17	1677	*Petunia*	
	otok Brač (32)	20	3,50 (0,02)	0,63	1712	*Petunia*	
C. solstitialis L. (*Dumulosae*)	17 Split, Marjan	16	1,95 (0,07)	3,69	954	*Petunia*	**1,74(0,03)**[3]

*SD = standardna devijacija; **CV = koeficijent varijacije; ***1 pg = 978 Mbp

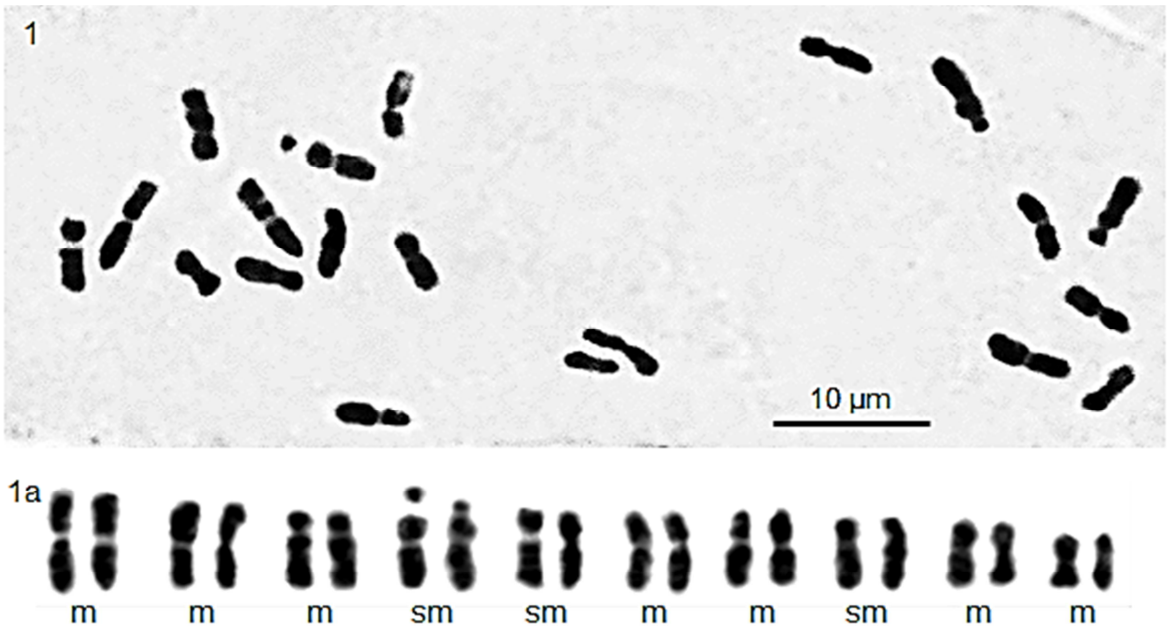
Broj kromosoma jedan je od ključnih kriterija u botaničkoj sistematici, pa je stoga pored morfološke botaničke determinacije korišten kao kriterij za utvrđivanje vrsta i u ovom doktorskom radu.

Broj kromosoma za vrstu *C. ragusina* prezentiran u ovom doktorskom radu iznosio je 2n = 20 i bio je u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja.[78] Veličina genoma kretala se u rasponu od 3,34 (± 0,02) do 3,61 (± 0,08) pg.

Veličina genoma kod vrste *C. ragusina* s otoka Visa i Marjana (Split) u suglasju je s dosad dobivenim podacima od Siljak-Yakovlev i sur. (2005) za navedenu vrstu s Dugog Otoka. Kod *C. ragusina* s otoka Palagruže dolazi do odstupanja u veličini genoma u usporedbi s ostalim populacijma s razlikom od 7%. Budući da su količine DNA ovih vrsta citometrijski mjerene u istim uvjetima, ta razlika može biti temelj za detaljnija citogenetska istraživanja kako bi se

utvrdilo radi li se o drugoj podvrsti ili zasebnoj vrsti. Botaničkom identifikacijom vrste s otoka Palagruže utvrđeno da se nedvojbeno radi o endemskoj vrsti *C. ragusina*, pa stoga ova razlika odstupanja za veličinu genoma može upućivati na postojanje podvrste koju je potrebno detaljnije istražiti i potvrditi. Odstupanje u veličini genoma kod populacije s otoka Palagruže može se povezati i s geološkim položajem toga otoka te specifičnim mikroklimatskim uvjetima na njemu. Zbog odstupanja u citogenetskim istraživanjima *C. ragusina* s Palagruže nije uzeta na razmatranje, u fitokemijskom smislu, u ovom doktorskom radu.

Poznato je da uslijed utjecaja različitih ekoloških čimbenika može doći do promjena unutar genoma. Ukoliko se veličina genoma razlikuje između proučavanih vrsta za 3–5%, tada se može razmatrati mogućnost pojave podvrste ili neke druge vrste.[49, 82]



Slika 4.2. Metafazni kromosomi vrste *Centaurea rupestris*

Rezultati dosadašnjih istraživanja vrste *C. rupestris* pokazali su da je broj kromosoma iznosio 2n = 20.[181] Broj kromosoma za vrstu *C. rupestris* prezentiran u ovom doktorskom radu iznosio je 2n = 20 i bio je u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja (**slika 4.2**). Kromosomi *C. rupestris* iz Republike Hrvatske detaljno su opisani po prvi put. Kariotip se sastojao od sedam parova metacentričnih (1, 2, 3, 6, 7, 9 i 10) i triju parova submetacentričnih kromosoma (4, 5 i 8), od kojih je četvrti par imao satelite (**slika 4.2**).

Jedinke vrste *Centaurea rupestris* mogu jako morfološki varirati, što može dovesti do pogreški prilikom botaničke determinacije. Tako su Conti i sur. (2011) opisali nekoliko vrsta unutar grupe kojoj pripada *C. rupestris* s brojnim morfološkim razlikama i zajedničkim brojem kromosoma 2n = 20. Te razlike u morfologiji česta su pojava u ovom rodu i najvjerovatnije su posljedica različitih ekoloških uvjeta u kojima populacije raste.[47] Detaljnija citogenetska istraživanja ove vrste stoga su od velika taksonomskog i fitokemijskog značaja jr na temelju njih možemo sa sigurnošću utvrditi da se radi o autentičnoj vrsti čiji fitokemijski profil želimo istraživati.

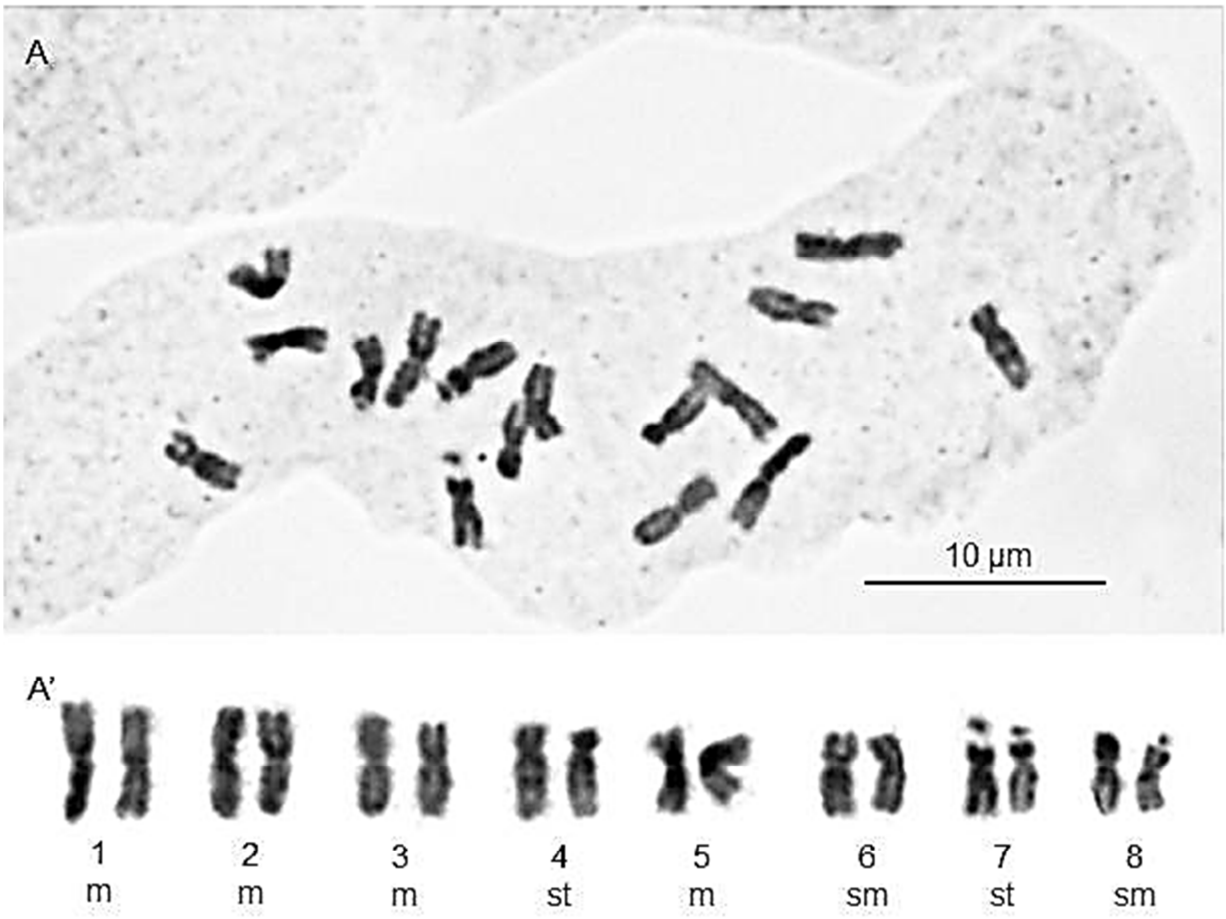
Veličina dosad istražena i literaturno prikazana genoma za vrstu *C. rupestris* iznosila je 2C = 2,33 (± 0,4) pg za vrstu s Biokova.[1] U drugom istraživanju i literaturnom nalazu kod ove vrste istraživane na Biokovu veličina genoma iznosila je 2C = 3,53(± 0,2) pg, dok je kod vrste iz Livanjskog polja iznosila 2C = 3,50 (± 0,2) pg.[56]

Veličina genoma dobivena u istraživanjima u ovom doktorskom radu za *C. rupestris* s čak 9 lokaliteta nalazila se u rasponu od 3,43 (± 0,04) do 3,64 (± 0,05) pg. Dobiveni podaci u skladu su s dvama prijašnjim nalazima za ovu vrstu, no ne slažu se s nalazom od 2C = 2,33 (± 0,4) pg. S obzirom na velik broj istraživanih populacija *C. rupestris* istraženih u ovom doktorskom radu i usklađenost rezultata s dvama prijašnjim nalazima možemo s velikom sigurnošću tvrditi da se veličine genoma za *C. rupestris* nalaze u okviru raspona dobivenih u ovom doktorskom radu.

Uočavamo kako postoje i blaga odstupanja unutar dobivenih vrijednosti za veličine genoma *C. rupestris* u ovom doktorskom radu, pa je tako zanimljivo primijetiti da populacijama s otoka Brača pripadaju nešto niže vrijednosti veličine genoma. Navedena blaga odstupanja i niže vrijednosti za *C. rupestris* mogu biti djelomično objašnjeni različitim internim standardom koji je korišten prilikom protočne citometrije. Osim toga odstupanja se mogu objasniti i utjecajem ekoloških uvjeta i tla kod vrsta s otoka Brača budući da je poznato kako na veličinu genoma mogu utjecati ekološki uvjeti i geološka podloga na kojoj vrste rastu.[69]

Centaurea solstitialis pripada *Hymenocentron-Mesocentron*-grupi zapadne mediteranske regije, gdje je klasifikacija unutar sekcije jako teška zbog česte interspecijske hibridizacije.[42, 52, 53, 77]

U ovom doktorskom radu broj kromosoma *C. solstitialis* iznosio je 2n = 16 (**slika 4.3**), što je u skladu s prijašnjim rezultatima.[3, 182-184] U prethodnim istraživanjima *C. solstitialis* imala je diploidan broj kromosoma, gdje je vrijednost 2n = 16.[3, 40, 77, 182, 183] Međutim u istraživanju te vrste iz Alžira dobivena je vrijednost za broj kromosoma od 2n = 18.[124, 184] Budući da se najveći broj istraživanja odnosi na 2n = 16, može se smatrati da kod istraženih vrsta s 2n = 18 postoje dva dodatna B-kromosoma (2n = 16 + 2B).



Slika 4.3. Metafazni kromosomi i kariogram vrste *Centaurea solstitialis*

Komosomi *C. solstitialis* iz Republike Hrvatske po prvi put su detaljno opisani. Kariotip se sastojao od četiriju paraova metacentričnih (1, 2, 3 i 5), dvaju parova submetacentričnih (6 i

8) i dvaju parova akrocentričnih kromosoma (4 i 7), od kojih su sedmi i osmi par imali satelite (**slika 4.3**).

Veličina genoma *C. solstitialis* izražena kao 2C-vrijednost, iznosila je 1,95 ± 0,07 pg. Ta je 2C-vrijednost smješta među vrste s vrlo malim genomom (1C ≤ 1,4 pg) prema Leitch et al. (1998).

Bancheva i Greilhuber (2006) te Garcia i sur. (2013) odredili su za istu vrstu vrijednosti 2C = 1,74 pg i 2C = 1,64 pg. Ta razlika u rezultatima može se povezati s različitim tehnikama određivanja veličine genoma (Feulgenova mikrodenzitometrija i protočna citometrija) ili s drugačijim internim standardima koji su korišteni u tim radovima.

Vrsta *C. solstitialis* imala je najmanji osnovni broj kromosoma, 2n = 16, i pokazala je najmanju veličinu genoma od 1,95 ± 0,07 pg. Ovakav nalaz u skladu je s prijašnjim istraživanjima u kojima vrste s malim brojem kromosoma imaju i malu veličinu genoma.[1, 49]

Mali osnovni broj kromosoma poput onog kod *C. solstitialis*, x = 8, karakteristika je jednogodišnjih vrsta iz roda *Centaurea*, koje imaju brži životni ciklus od trajnica.[42, 53, 77]

Pregledom baze podataka za vrijednosti veličine genoma kod dosad istraženih vrsta iz porodice *Asteraceae* (GSAD) uočavamo da varijacije u 2C-vrijednostima za vrste s istim brojem kromosoma mogu biti i do 2000 puta. Međutim te su varijacije mnogo manje kada se promatraju vrijednosti unutar užih sistematskih kategorija kao što su naprimjer sekcije ili rodovi.

Sve tri proučavane vrste pripadaju različitim sekcijama, pa su stoga i razlike u veličini genoma bile očekivane, budući da je poznato kako su razlike u veličini genoma među vrstama iz različitih sekcija značajne.[1]

U prijašnjim istraživanjima u botaničkoj taksonomiji najpouzdaniji podaci prilikom određivanja i raspodjele vrsta bili su broj kromosoma i izgled peludnih zrnaca.[3] Danas znamo da je veličina genoma jedna od ključnih vrijednosti u botaničkoj sistematici i određivanju vrsta.[1, 3, 49, 67, 68, 79]

Danas je poznata veličina genoma za samo 50 od 400 do 700 *Centaurea*-vrsta, što govori o velikom značaju svakoga novog podatka o veličini genoma.[80]

Veličina genoma vrsta roda *Centaurea* nalazi se u rasponu od 1,64 do 4,30 pg. [1, 3, 69, 82-84] Zbog toga vrste roda *Centaurea,* prema Leitch i sur. (1998), pripadaju skupini vrsta s malom ili vrlo malom veličinom genoma.

Dobiveni citogenetski rezultati u ovom doktorskom radu u skladu su s prijašnjim rezultatima kako za veličinu genoma tako i za broj kromosoma proučavanih vrsta. Vrijednost je podataka iz ovog rada tim veća što su se istraživanja vodila na većem broju populacija i što su dobiveni rezultati uvijek bili u skladu s morfološkom determinacijom taksona. Time je potvrđeno da su vrste koje želimo istraživati i u fitokemijskom smislu, *C. ragusina, C. rupestris* i *C. solstitialis*, autentične. Nakon citogenetske potvrde rezultati istraživanja fitokemije moći će se promatrati kao autentični podaci za navedene vrste, određene bez dvojbi prilikom botaničke determinacije.

U ovom radu prikazani su prvi podaci o količini jezgrine DNA kod populacija i odabranih vrsta roda *Centaurea* s jadranskog područja, među kojima je bilo i endemskih i zaštićenih vrsta. Dobiveni su rezultati prvi citogenetski podaci za populacije vrsta *C. ragusina, C. rupestris* i *C. solstitialis* u RH s navedenih lokaliteta. Time se pridonosi dobivanju ukupnih informacija o citogenetici tih vrsta i proširenju informacija u globalnoj bazi podataka o veličini njihovih genoma.

4.2. Fitokemijski profil biljaka roda *Centaurea*

Fitokemijski su proučavane vrste *Centaurea ragusina* s brda Marjan u Splitu i s otoka Visa, *Centaurea solstitialis* s brda Marjan u Splitu, *Centaurea rupestris* s lokaliteta Malačka na brdu Kozjak i s otoka Krka. Fitokemijski su proučavane vrste čija je autentičnost potvrđena citogenetskim analizama. Destilacijom vodenom parom uz pomoć aparature po Clavengeru iz nadzemnih dijelova biljaka izolirana su eterična ulja iz navedenih vrsta. Ulja su bila prozirna, blagožućkaste boje i karakteristična mirisa.

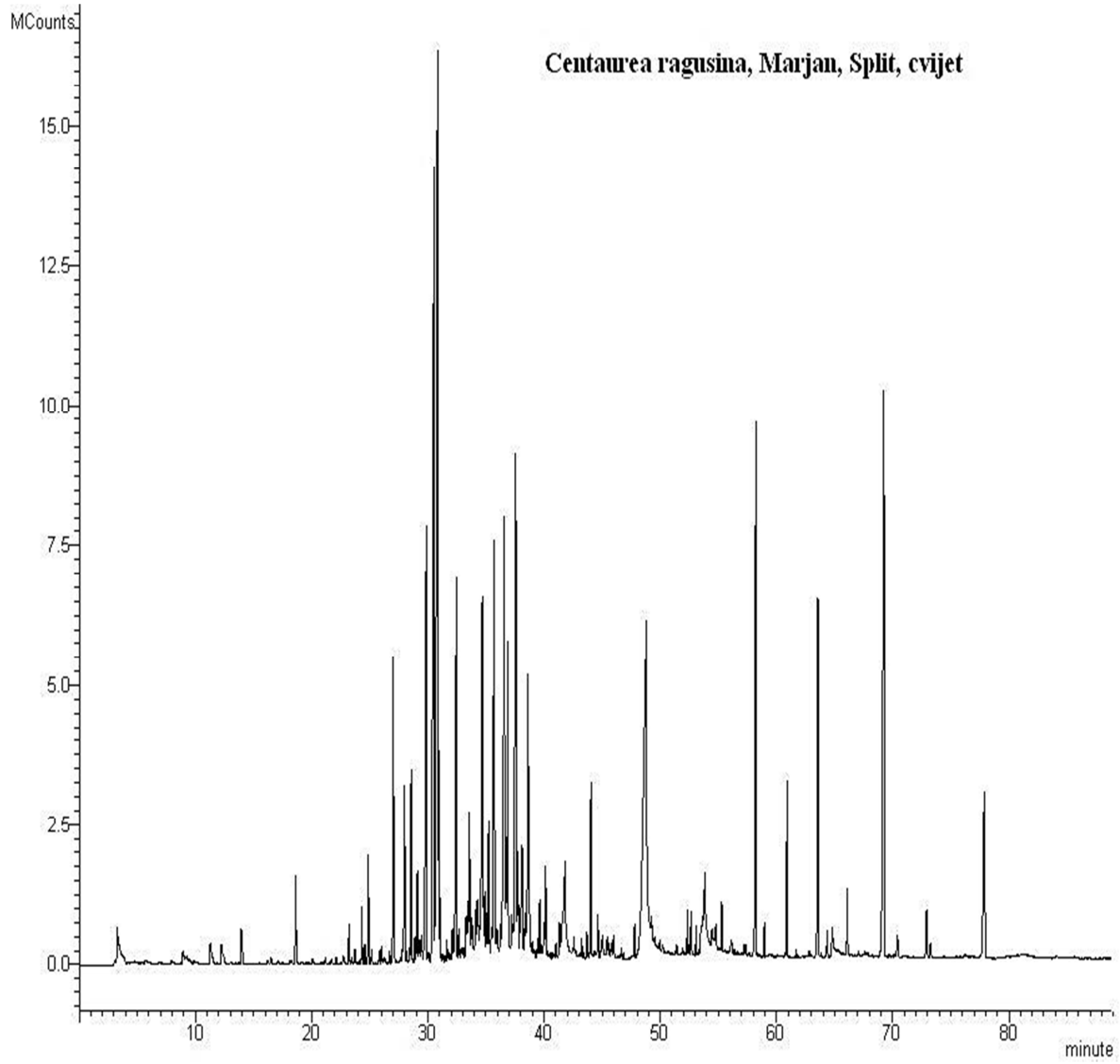
Sastav hlapljivih komponenti eteričnih ulja određen je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC/MS). Spojevi su identificirani prema vremenima zadržavanja na kromatografskoj koloni VF-5MS te uz pomoć masenog spektrometra. Prikazani su kromatogrami ukupne ionske struje istraživanih eteričnih ulja, a u tablicama su prikazani maseni udjeli pojedinih komponenti. Maseni udio pojedine komponente izražen je postotkom i predstavlja udio površine pika toga sastojka u ukupnoj površini svih pikova.

Kemijski sastav hlapljivih spojeva eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Centaurea* prikazan je u **tablici 4.2.** za *Centaurea ragusina* s lokaliteta Marjan, Split i Vis, u **tablici 4.3.** za vrstu *Centaurea rupestris* s dvaju lokaliteta: Malačke na Kozjaku i otoka Krka, a u **tablici 4.4.** prikazan je sastav eteričnog ulja *Centaurea solstitialis* s Marjana kod Splita.

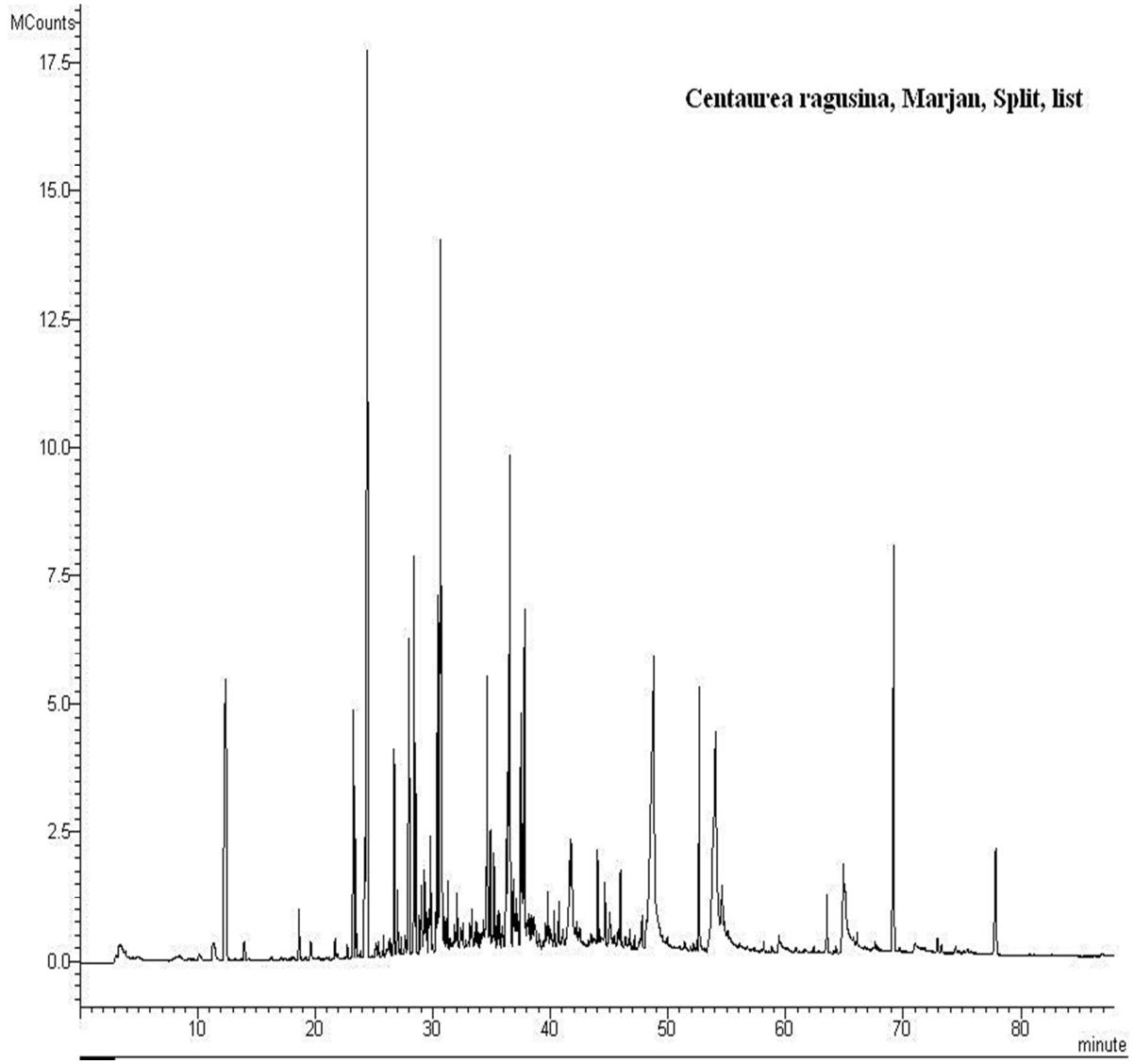
Eterična ulja istražena u ovom doktorskom radu prva su istraživanja eteričnog ulja vrsta *C. ragusina*, *C. solstitialis* i *C. rupestris* sabranih na području Republike Hrvatske. Istraživanja eteričnog ulja endemične vrste *C. ragusina* prvo je i jedino istraživanje ove vrste.

Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnih ulja biljaka roda Centaurea

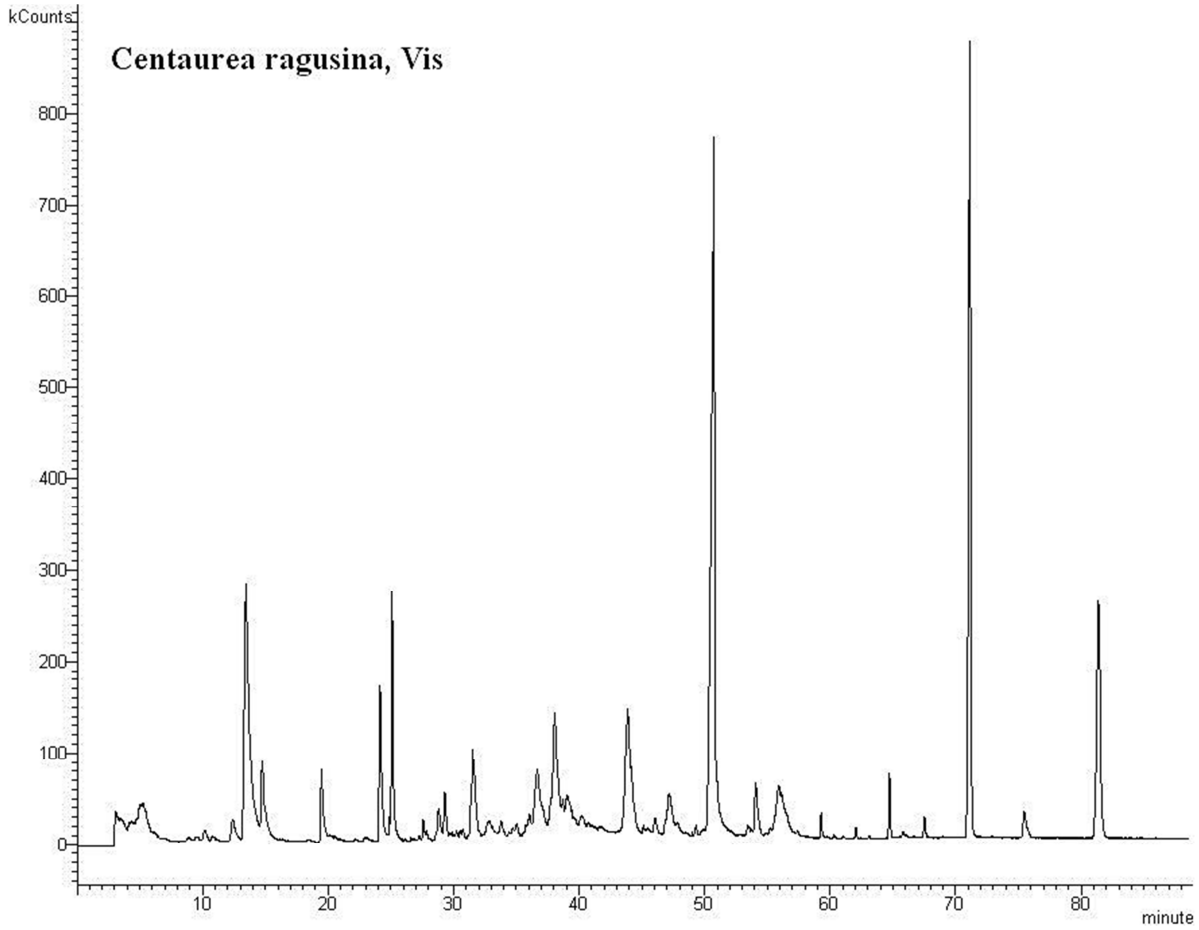
Eterično ulje vrste *Centaurea ragusina*, Marjan, Split, ubrane u 2009. godini u sklopu preliminarnih istraživanja, izolirano je iz listova i cvjetova navedene vrste i njegov sastav prikazan je u **tablici 4.2.** U istoj je tablici prikazan i sastav ulja iste vrste s lokaliteta na otoku Visu, a na **slikama 4.4. - 4.6.** prikazani su kromatogrami ukupne ionske struje eteričnih ulja *C. ragusina* sa svih triju navedenih lokaliteta.



Slika 4.4. Kromatogrami ukupne ionske struje eteričnog ulja izoliranog iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split



Slika 4.5. Kromatogrami ukupne ionske struje eteričnog ulja izoliranog iz listova *C. ragusina*, Marjan, Split



Slika 4.6. Kromatogrami ukupne ionske struje eteričnog ulja izoliranog iz *C. ragusina*, Vis

U eteričnim uljima *Centaurea ragusina* identificirano je ukupno 109 komponenti, od čega je u eteričnom ulju izoliranom iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, identificirano 70 komponenti, u eteričnom ulju izoliranom iz listova *C. ragusina*, Marjan, Split, 75 komponenti, dok su u eteričnom ulju *C. ragusina*, Vis, identificirane ukupno 34 komponente (**tablica 4.2**).

Tablica 4.2. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnih ulja *Centaurea ragusina*

	Naziv komponente	*C. ragusina* cvjetovi Marjan *[%, w]*	*C. ragusina* listovi Marjan *[%,w]*	*C. ragusina* otok Vis *[%,w]*	KI	Način identifikacije
	Terpenski spojevi	**69,9**	**41,0**	**16,0**		
	Neoksidirani Monoterpeni	***tr***	***tr***	-		
1.	*p*-cimen	tr	tr	-	1030	KI, MS
2.	Limonen	tr	tr	-	1033	KI, MS
	Oksidirani monoterpeni	**-**	***1,1***	**-**		
3.	*trans*-linalool oksid	-	0,2	-	1089	KI, MS
4.	Linalool	-	0,3	-	1002	KI, MS
5.	*p*-cimen-8-ol	-	0,1	-	1189	KI, MS
6.	*α*-terpineol	-	0,3	-	1193	KI, MS
7.	Geraniol	-	0,1	-	1258	KI, MS
8.	Timol	-	0,1	-	1299	KI, MS
	Neoksidirani Seskviterpeni	***47,9***	***23,4***	***9,6***		
9.	Bicikloelemen	-	-	3,6	1325	KI, MS
10.	*δ*-elemen	2,0	3,0	-	1337	KI, MS
11.	*β*-ilangen	0,1	0,1	-	1370	KI, MS
12.	ß-kubenen	-	-	0,3	1381	KI, MS
13.	ß-burbonen	-	0,1	0,2	1387	KI, MS
14.	Longifolen	-	-	0,7	1408	KI, MS
15.	*α*-cedren	0,2	-	-	1417	KI, MS
16.	ß-kariofilen	6,6	1,0	1,0	1420	KI, MS
17.	ß-kopaen	-	-	0,2	1431	KI, MS
18.	*trans*-*α*-bergamoten	3,0	2,7	-	1436	KI, MS
19.	*α*-humulen	0,5	tr	0,5	1456	KI, MS
20.	(*E*) -ß-farnezen	-	-	0,3	1442	KI, MS
21.	(*Z*)-ß-farnezen	3,5	1,4	-	1460	KI, MS
22.	ß-santalen	0,6	0,4	-	1463	KI, MS
23.	ß-akoradien	0,1	-	-	1468	KI, MS
24.	*γ*-muurolen	9,1	3,2	-	1474	KI, MS
25.	germakren D	17,1	4,3	2,8	1484	KI, MS
26.	ß-selinen	0,1	5,0	-	1488	KI, MS
27.	Biciklogermakren	-	0,4	-	1490	KI, MS
28.	germakren A	0,2	tr	-	1492	KI, MS
29.	*α*-selinen	0,2	-	-	1495	KI, MS
30.	Eremofilen	-	0,2	-	1498	KI, MS
31.	*α*-muurolen	0,1	-	-	1501	KI, MS
32.	*α*-farnezen	0,1	tr	-	1507	KI, MS
33.	ß-bisabolen	tr	-	-	1508	KI, MS
34.	*γ*-kadinen	0,2	-	-	1517	KI, MS
35.	*δ*-kadinen	0,5	0,9	-	1527	KI, MS
36.	ß-seskvifelandren	2,7	-	-	1531	KI, MS

37.	germakren B	1,6	0,7	-	1558	KI, MS
	Oksidirani seskviterpeni	***21,7***	***15,2***	***6,4***		
38.	kariofilen-oksid	3,4	2,2	-	1584	KI, MS
39.	dihidro-*cis*-α-kopaen-8-ol	0,5	0,3	-	1631	- , MS
40.	Izospatulenol	4,8	7,6	4,4	1639	KI, MS
41.	kariofilenol II	3,0	0,7	-	1644	KI, MS
42.	τ-kadinol	0,5	0,8	-	1646	KI, MS
43.	τ-muurolol	0,9	1,7	-	1643	KI, MS
44.	ß-eudezmol	0,9	0,2	2,0	1653	KI, MS
45.	7-epi-α-eudezmol	0,5	0,4	-	1659	KI, MS
46.	α-bisabolol	3,6	1,3	-	1687	KI, MS
	Oksidirani diterpeni	***0,3***	***0,2***	**-**		
47.	Fitol	0,3	0,2	-	2119	KI, MS
	Neterpenski spojevi	**19,7**	**48,2**	**74,7**		
	Fenilpropanski spojevi	***0,1***	***2,1***	**-**		
48.	4-etil-2-metoksifenol	0,1	1,0	-	1316	KI, MS
49.	eugenol	-	0,3	-	1360	KI, MS
50.	metil eugenol	-	0,8	-	1404	KI, MS
	Ugljikovodici	***12,2***	***21,3***	***20,0***		
51.	*m* ksilen	tr	tr	-	872	- , MS
52.	nonan	tr	tr	-	900	KI, MS
53.	tetradeken	-	0,4	-	1393	KI, MS
54.	tetradekan	-	0,1	-	1400	KI, MS
55.	pentadeken	0,2	0,5	-	1493	KI, MS
56.	pentadekan	-	tr	1,1	1500	KI, MS
57.	heksadeken	0,2	1,0	-	1592	KI, MS
58.	heksadek-3-en	-	0,1	-	1595	KI, MS
59.	heksadekan	0,2	0,2	-	1600	KI, MS
60.	ciklookta-1,3-dien	4,6	13,6	-	1666	- , MS
61.	heptadeken	tr	0,6	-	1692	KI, MS
62.	oktadeken	0,3	1,2	-	1792	KI, MS
63.	oktadekan	0,1	0,1	-	1800	KI, MS
64.	ikosan	0,1	1,1	-	2000	KI, MS
65.	henikosan	0,3	-	-	2100	KI, MS
66.	nonadekan	0,1	tr	-	1900	KI, MS
67.	dokosan	0,2	0,8	-	2200	KI, MS
68.	trikos-9-en	0,2	-	-	2295	KI, MS
69.	trikosan	-	-	0,3	2300	KI, MS
70.	tetrakosan	4,9	-	0,1	2400	KI, MS
71.	pentakosan	0,8	1,6	0,6	2500	KI, MS
72.	heksakosan	-	-	0,3	2600	KI, MS
73.	heptakosan	-	-	11,7	2700	KI, MS
74.	oktakosan	-	-	0,4	2800	KI, MS
75.	nonakosan	-	-	5,5	2900	KI, MS
	Aldehidi	***4,1***	***3,1***	***12,0***		

76.	heksen-2-al	-	-	2,9	860	KI, MS
77.	benzaldehid	-	0,2	-	967	KI, MS
78.	2-fenilacetaldehid	0,2	0,2	0,9	1052	KI, MS
79.	okten-2-al	0,3	-	-	1064	KI, -
80.	nonanal	0,3	0,1	2,8	1105	KI, MS
81.	dekanal	0,4	0,1	1,4	1207	KI, MS
82.	undekanal	0,2	0,5	2,7	1305	KI, MS
83.	4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid	2,2	-	-	1397	KI, -
84.	dodekanal	-	tr	-	1405	KI, MS
85.	pentadekanal	0,3	2,0	1	1707	KI, MS
86.	2-heksil-cinamaldehid	-	tr	-	1743	KI, MS
87.	heksadekanal	0,1	-	0,3	1807	KI, MS
88.	heptadekanal	tr	-	-	1920	KI, MS
89.	oktadekanal	0,1	-	-	2020	KI, MS
	Ketoni	***1,8***	***10,3***	***9,5***		
90.	okt-1-en-3-on	-	tr	-	980	KI, MS
91.	acetofenon	0,4	10,3	9,5	1069	KI, MS
92.	tridekan-2-on	0,2	-	-	1497	KI, MS
93.	pentadekan-2-on	0,2	-	-	1698	KI, MS
94.	heksahidro farnezil aceton	1,0	tr	-	1841	KI, MS
	Alkoholi	***tr***	***0,5***	***-***		
95.	heks-3-en-1-ol	-	tr	-	857	- , MS
96.	heksan-1-ol	-	0,1	-	867	- , MS
97.	heksadekan-1-ol	tr	0,3	-	1885	KI, MS
98.	(*Z*)-oktadek-9-en-1-ol	tr	0,1	-	2062	KI, MS
	Kiseline	***1,3***	***11,5***	***28,8***		
99.	tetradekanska kiselina	0,2	0,6	5,7	1770	KI, MS
100.	pentadekanska kiselina	-	-	1,9	1887	KI, MS
101.	heksadekanska kiselina	0,8	0,3	17,7	1958	KI, MS
102.	oktadek-9-enska kiselina	0,3	10,6	-	2145	KI, MS
103.	α-linolenska kiselina	-	-	3,5	2161	KI, MS
	Esteri	***0,4***	***0,2***	***4,1***		
104.	metil-dodekanoat	-	-	0,7	1528	KI, MS
105.	etil-dodekanoat	-	-	3,4	1598	KI, MS
106.	benzil-benzoat	0,1	0,1	-	1765	KI, MS
107.	isopropil-miristat	0,3	0,1	-	1821	KI, MS
	Ostali spojevi	***-***	***tr***	***0,3***		
108.	2-pentilfuran	-	-	0,3	985	KI, MS
109.	2,3-dihidro-1- benzofuran	-	tr	-	1238	KI, MS
	UKUPNO	**89,6**	**88,9**	**90,7**		

KI = Kovačev indeks, određen na HP-5MS koloni korištenjem homologne serije *n*-alkana; tr = tragovi (< 0,1%); MS = identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara *NIST02* i *Wiley 7*.

U eteričnom ulju izoliranom iz cvijetova *C. ragusina*, Marjan, Split, terpenski su spojevi najzastupljenije klase spojeva, s udjelom od 69,9%, dok su kod eteričnog ulja listova *C.*

ragusina, Marjan, Split, i eteričng ulja izoliranom iz *C. ragusina*, Vis, zastupljeni u udjelima od 41,0% i 16,0% i nisu dominanta skupina spojeva.

Među terpenskim spojevima neoksidirani seskviterpeni najzastupljeniji su u ulju cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, listova *C. ragusina*, Marjan, Split, i eteričnog ulja *C. ragusina*, Vis, s udjelima od 47,9%; 23,4% i 9,6%, dok su oksidirani seskviterpeni zastupljeni s udjelima od 21,7%, 15,2% i 6,4%.

Monoterpeni se u eteričnom ulju cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, i *C. ragusina*, Vis, nalaze u tragovima, dok su kod eteričnog ulja listova *C. ragusina*, Marjan, Split, zastupljeni udjelom od 1,1% sa spojevima *trans*-linalool-oksid, linalool, *p*-cimen-8-ol, *α*-terpineol, geraniol i timol.

U eteričnom ulju izoliranom iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, najzastupljeniji seskviterpen je germakren D, s udjelom od 17,1%, i γ-muurolen, s 9,1%, dok su od oksidiranih seskviterpena u navedenom eteričnom ulju najzastupljeniji izospatulenol i *α*-bisabolol, s udjelima od 4,8% i 3,6%.

U eteričnom ulju izoliranom iz listova *C. ragusina*, Marjan, Split, najzastupljeniji seskviterpen je germakren D, s udjelom od 4,3%, i *β*-selinen, s 5,0%, dok su od oksidiranih seskviterpena najzastupljeniji izospatulenol i kariofilen-oksid, s udjelima od 7,6% i 2,2%.

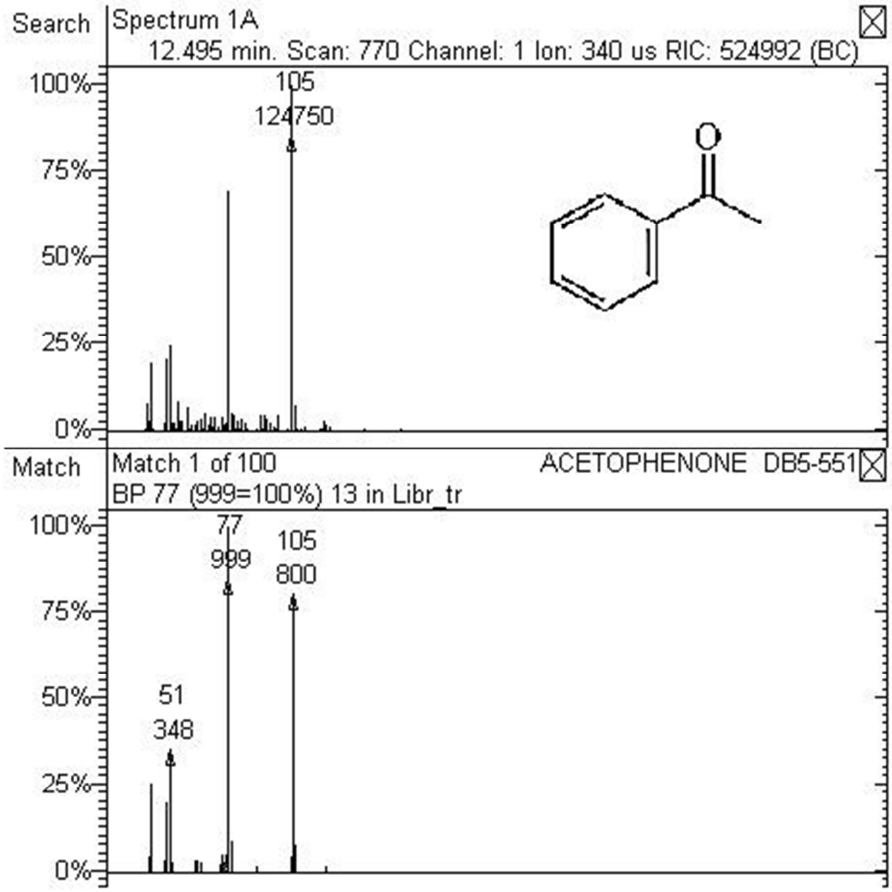
Eterično ulje izolirano iz *C. ragusina*, Vis, kao najzastupljeniji seskviterpen ima biciklоelemen (3,6%) i germakren D (2,8%), dok su od oksidiranih seskviterpena najzastupljeniji izospatulenol i *β*-eudezmol, s udjelima od 4,4% i 2,0%.

Diterpenski alkohol fitol identificiran je u eteričnom ulju izoliranom iz cvjetova i listova *C. ragusina*, Marjan, Split, s udjelima od 0,3% i 0,2%, dok u eteričnom ulju *C. ragusina*, Vis, nije identificiran.

Kod eteričnog ulja izoliranom iz listova *C. ragusina*, Marjan, Split, i eteričnom ulju izoliranom iz *C. ragusina*, Vis, dominantnu skupinu spojeva predstavljaju neterpenski

spojevi, s udjelima od 48,2% i 74,4%, dok su kod eteričnog ulja cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, neterpenski spojevi zastupljeni s udjelom od 19,7%.

U eteričnom ulju izoliranom iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, najzastupljeniji identificirani neterpenski spojevi su ugljikovodici (12,2%). Slijede aldehidi (4,1%), ketoni (1,8%), kiseline (1,3%) i esteri (0,4%). Od ugljikovodika su najzastupljeniji tetrakozan (4,9%) i ciklookta-1,3-dien (4,6%); od aldehida je najzastupljeniji 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid (2,2%); od ketona hidroksi-farnezil aceton (1,0%); od kiselina heksadekanska kiselina (0,8%) i od estera isopropil-miristat (0,3%). Alkoholi su identificirani tek u tragovima.



Slika 4.7. Identifikacija acetofenona pomoću spektra masa

U eteričnom ulju izoliranom iz listova *C. ragusina*, Marjan, Split, kao najzastupljeniji neterpenski spojevi identificirani su ugljikovodici (21,3%), kiseline (11,5%), ketoni (10,3%), aldehidi (3,1%), alkoholi (0,5%) i esteri (0,2%). Od ugljikovodika su najzastupljeniji

ciklookta-1,3-dien (13,6%) i pentakozan (1,6%); od aldehida je najzastupljeniji pentadekanal (2,0%); od ketona acetofenon (10,3%); od alkohola heksadekanol (0,3%); od kiselina oktadek-9-enska kiselina (10,6%) i od estera isopropil-miristat i benzil-benzoat s jednakim udjelom od 0,1% (**slika 4.7**).

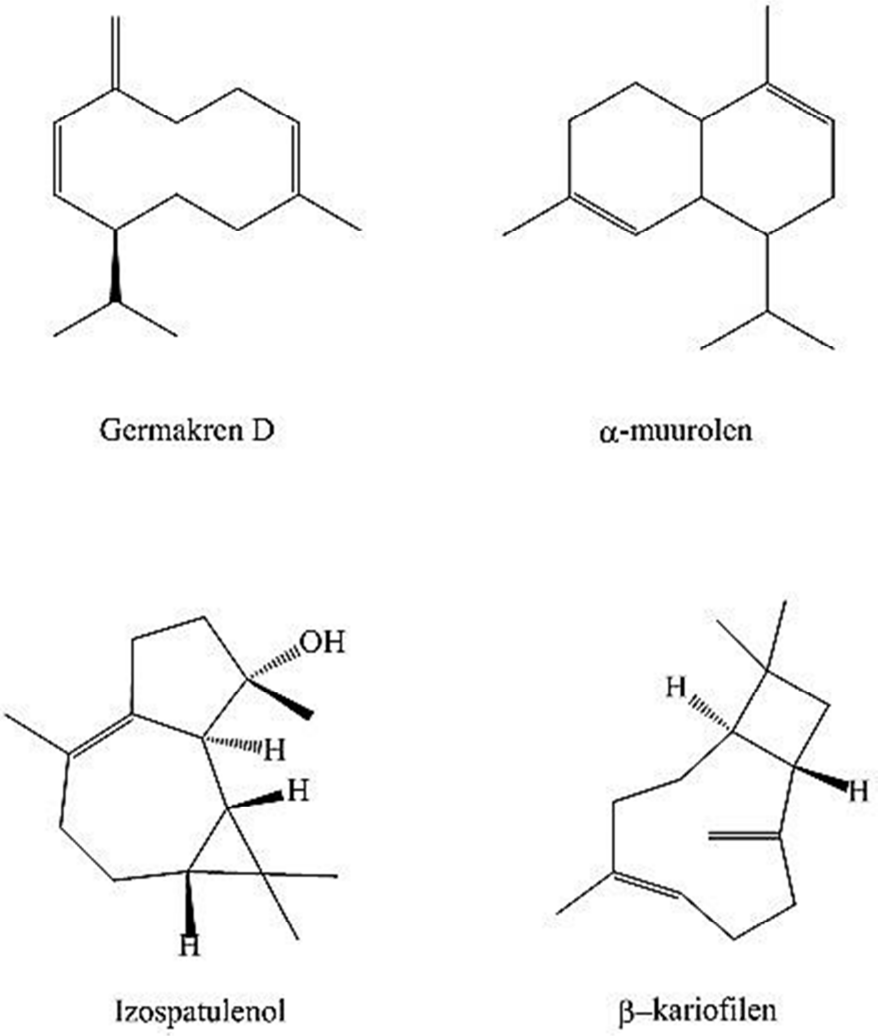
Eterično ulje izolirano iz *C. ragusina*, Vis, sadrži kiseline kao najzastupljenije neterpenske spojeve (28,8%), slijede ugljikovodici (20,0%), zatim aldehidi (12,0%), ketoni (9,5%) i esteri (4,1%). Od kiselina su najzastupljenije heksadekanska (17,7%) i tetradekanska kiselina (5,7%); od ugljikovodika su najzastupljeniji heptakozan (11,7%) i nonakozan (5,5%); od aldehida (*E*)-2-heksenal (2,9%); od ketona acetofenon (9,5%) i od estera etil-dodekanoat (3,4%), dok alkoholi nisu identificirani.

Od ostalih spojeva u sastavu eteričnog ulja cvjetova i listova *C. ragusina*, Marjan, Split, identificirani su fenilpropanski spojevi, s udjelima od 0,1% i 2,1%, dok u eteričnom ulju *C. ragusina*, Vis, nisu identificirani.

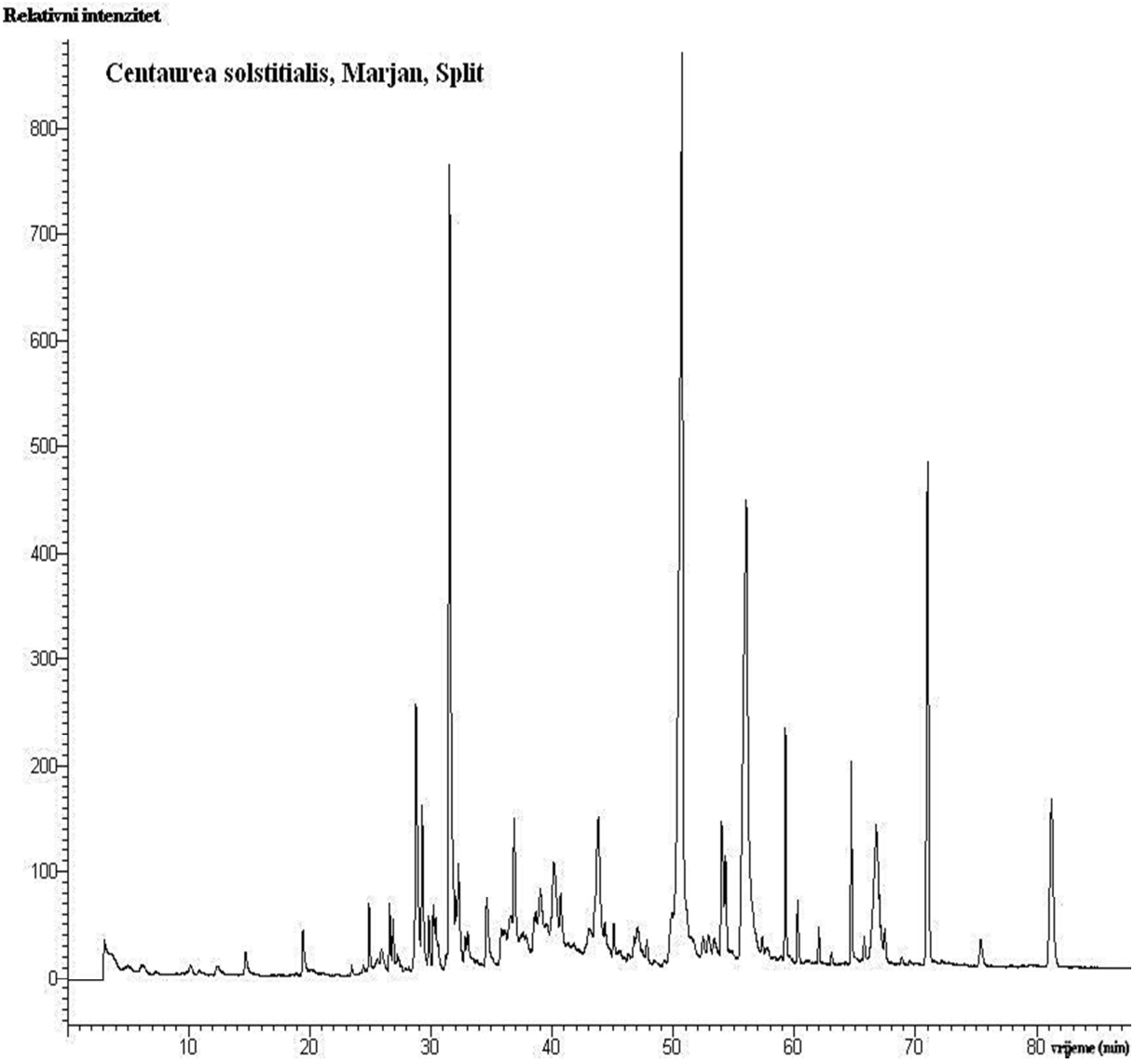
Germakren D (17,1%), γ-muurolen (17,9%), tetrakozan (4,9%), izospatulenol (4,8%) i ciklookta-1,3-dien (4,6%) najzastupljenije su komponente eteričnog ulja cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split (**slika 4.8**).

Ciklookta-1,3-dien (13,6%), oktadek-9-enska kiselina (10,6%), acetofenon (10,3%), izospatulenol (7,6%), *β*-selinen (5,0%) i germakren D (4,3%) najzastupljenije su komponente eteričnog ulja listova *C. ragusina*, Marjan, Split.

Heksadekanska kiselina (17,7%), heptakozan (11,7%), acetofenon (9,5%) i tetradekanska kiselina (5,7%) najzastupljenije su komponente eteričnog ulja *C. ragusina*, Vis.



Slika 4.8. Neki od seskviterpenskih spojeva identificiranih u eteričnom ulju *Centaurea ragusina*.



Slika 4.9. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja izoliranog iz *C. solstitialis*, Marjan, Split

U eteričnom ulju izoliranom iz *Centaurea solstitialis*, Marjan, Split, identificirano je ukupno 25 komponenti. Kemijski profil i maseni udjeli pojedinih komponentu u eteričnom ulju vrste *C. solstitialis* predstavljeni su u **tablici 4.3**, a kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja **slikom 4.9**.

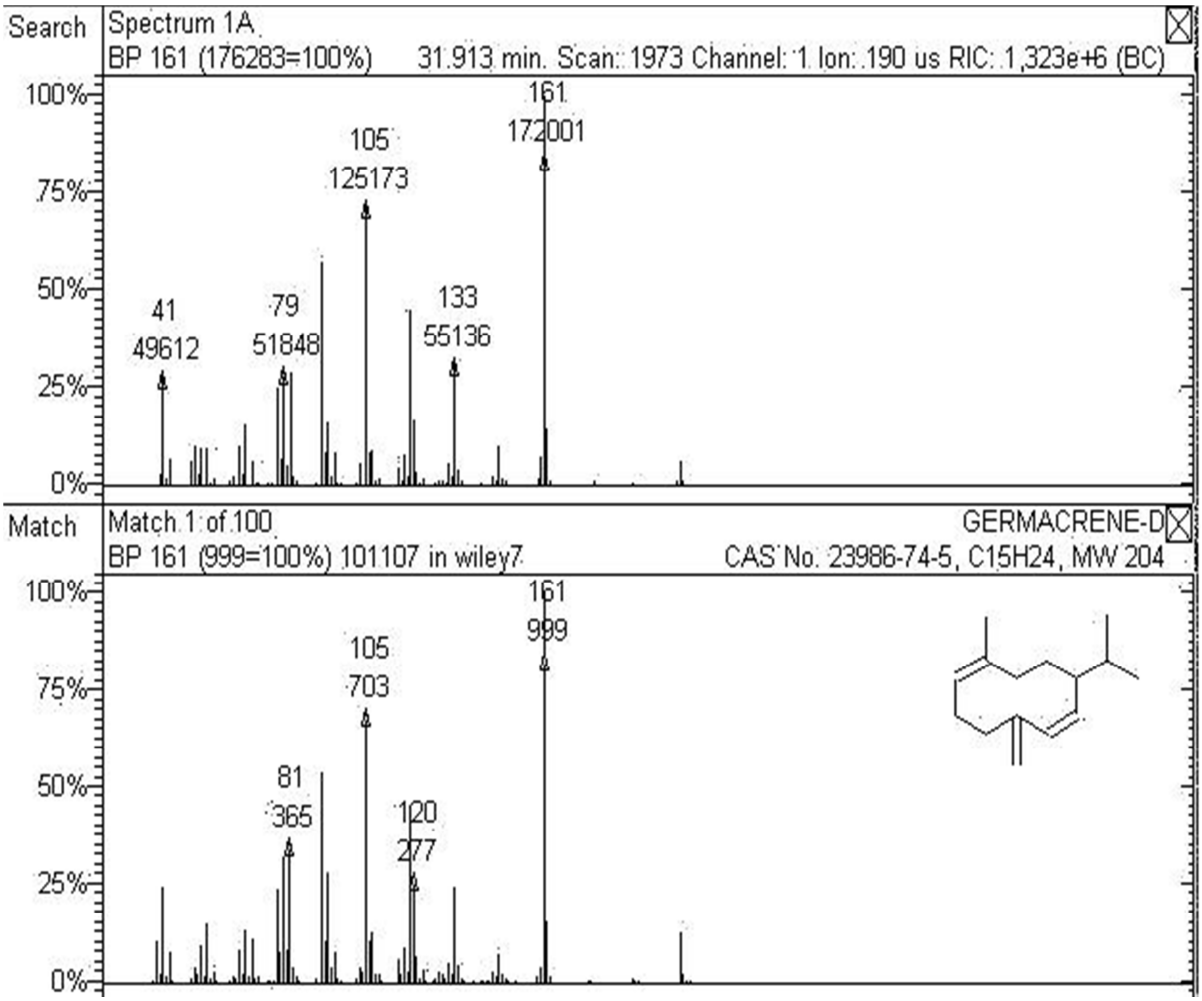
Tablica 4.3. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja *Centaurea solstitialis*

	Naziv komponente	(%, w)	KI	Način identifikacije
	Terpenski spojevi	***28,8***		
	Neoksidirani Seskviterpeni	***23,8***		
1.	bicikloelemen	0,4	1328	KI, MS
2.	ß-ilangen	0,6	1362	KI, MS
3.	α-kopaen	0,5	1372	KI, MS
4.	ß-elemen	Tr	1391	KI, MS
5.	longifolen	3,6	1411	KI, MS
6.	ß-kariofilen	1,6	1416	KI, MS
7.	γ-elemen	0,5	1437	KI, MS
8.	kalaren	0,5	1451	KI, MS
9.	germakren D	15,3	1482	KI, MS
10.	biciklogermakren	0,8	1495	KI, MS
	Oksidirani seskviterpeni	***1,5***		
11.	aromadendren-oksid	1,5	1671	KI, MS
	Oksidirani diterpen	***3,5***		
12.	fitol	3,5	2115	KI, MS
	Neterpenski spojevi	***66,1***		
	Fenilpropanski spojevi	***0,3***		
13.	*p*-vinil-gvajakol	0,3	1316	KI, MS
	Ugljikovodici	***19,1***		
14.	trikosan	2,3	2300	KI, MS
15.	tetrakosan	0,4	2400	KI, MS
16.	pentakosan	2,0	2500	KI, MS
17.	heksakosan	0,4	2600	KI, MS
18.	heptakosan	8,1	2700	KI, MS
19.	oktakosan	0,1	2800	KI, MS
20.	nonakosan	5,8	2900	KI, MS
	Aldehidi	***2,7***		
21.	nonanal	0,3	1102	KI, MS
22.	dekanal	0,3	1203	KI, MS
23.	tetradekanal	2,1	1609	KI, MS
	Kiseline	***44,0***		
24.	heksadekanska kiselina	26,1	1982	KI, MS
25.	α-linolenska kiselina	17,9	2169	KI, MS
	UKUPNO	**94.9**		

KI = Kovačev indeks, određen na HP-5MS koloni korištenjem homologne serije *n*-alkana; tr = tragovi (< 0,1 %); MS = identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara *NIST02* i *Wiley 7*.

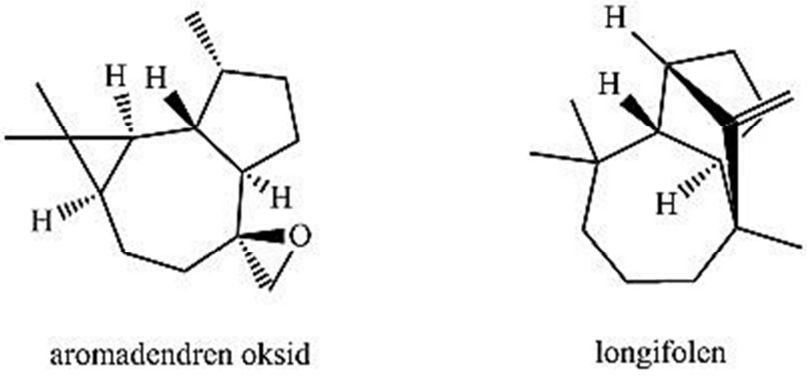
Eterično ulje izolirano iz *Centaurea solstitialis*, Marjan, Split, sadrži 66,1% neterpenskih spojeva i 28,8% terpenskih spojeva. Među terpenskim spojevima seskviterpeni su dominantni, s udjelom od 23,8%, dok je od oksidiranih seskviterpena identificirana samo jedna

komponenta: aromadendren-oksid, prisutan s udjelom od 1,5% (**slika 4.10**). Diterpeni su također zastupljeni s jednom komponentom, diterpenskim alkoholom fitolom, s udjelom od 3,5%. Monoterpeni nisu identificirani u sastavu ovoga eteričnog ulja.



Slika 4.10. Identifikacija germakrena D pomoću spektra masa

Među neoksidiranim seskviterpenima germakren D dominantna je komponenta ovog ulja (15,3%), a slijede longifolen (3,6%) i *β*-kariofilen (1,6%), od oksidiranih seskivterpena prisutan je samo aromadendren-oksid (1,5%) (**slika 4.11**).



aromadendren oksid longifolen

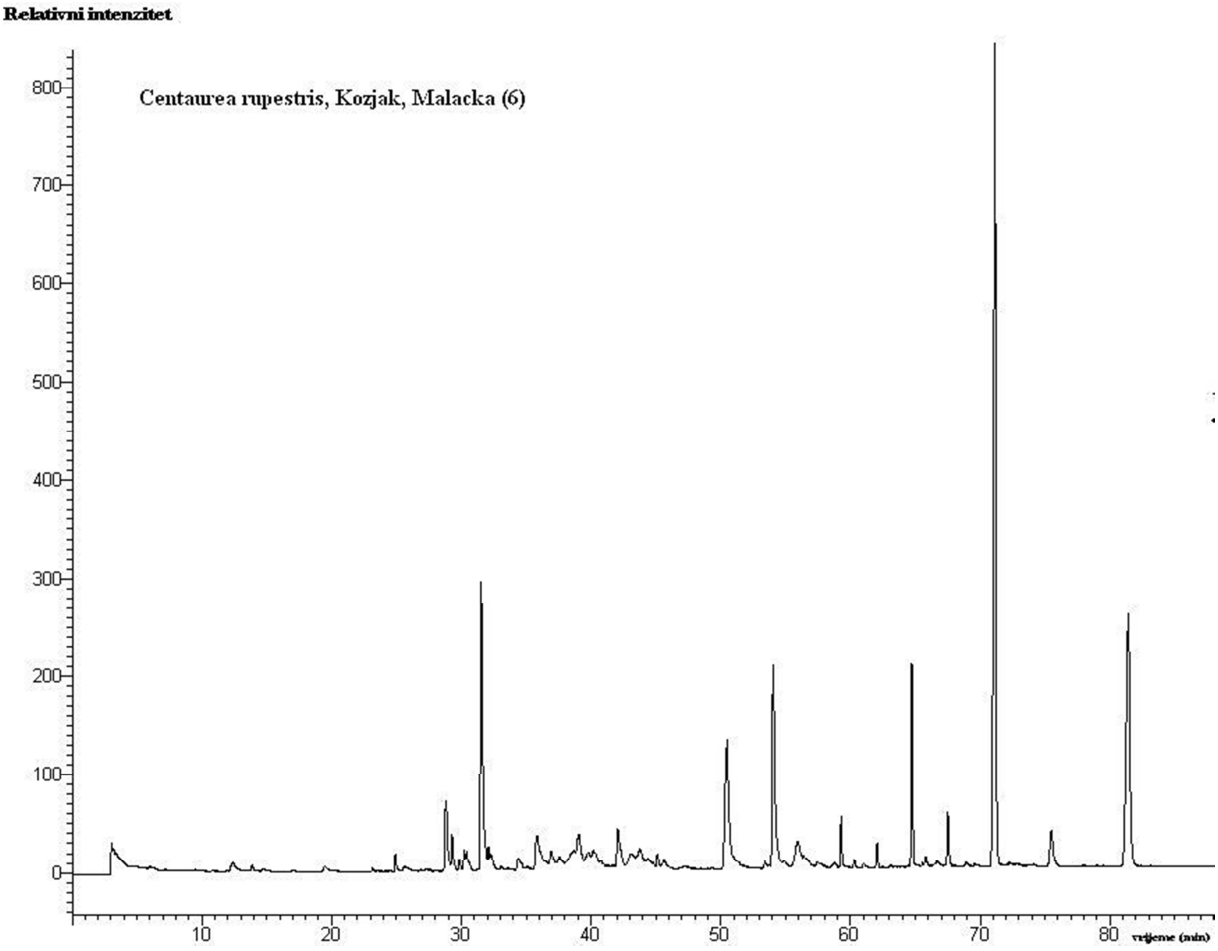
Slika 4.11. Neki od seskviterpenskih spojeva identificiranih u eteričnom ulju *Centaurea solstitialis*.

Neterpenski spojevi kao dominantno zastupljene spojeve sadrže kiseline (44,5%); slijede ugljikovodici (19,1%) i aldehidi (2,7%).

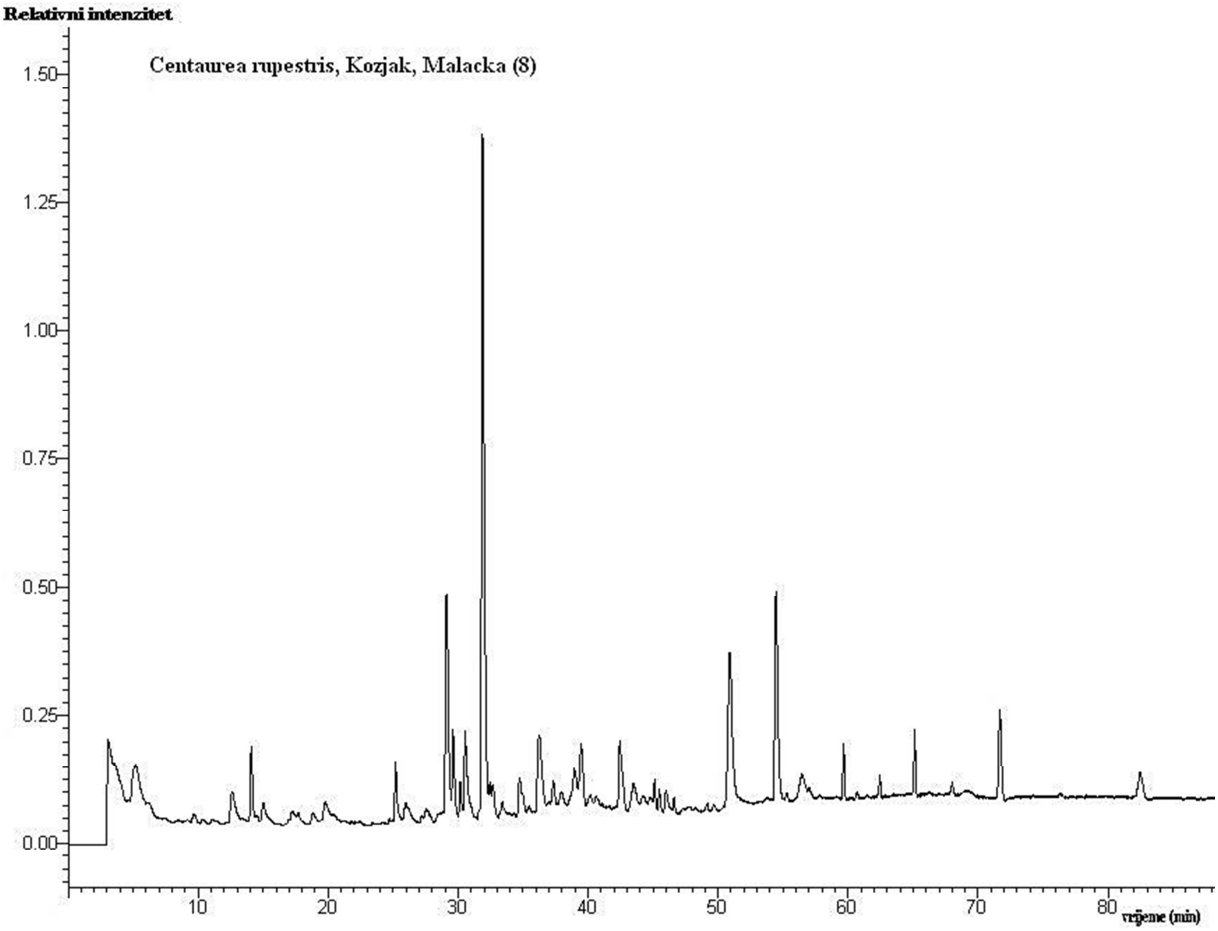
Od kiselina u ovom eteričnom ulju najzastupljenija je alifatska masna kiselina heksadekanska kiselina (26,1%), a slijedi α-linolenska kiselina (17,9%). Od aldehida su prisutna tri spoja, od kojih je najzastupljeniji tetradekanal (2,7%). Od ugljikovodika najzastupljeniji je heptakozanom (8,1%), a slijede ga nonakozan (5,8%), trikozan (2,3%) i pentakozan (2,0%).

Eterično ulje izolirano iz *Centaurea solstitialis*, Marjan, Split, od fenil-propanskih spojeva sadrži *p*-vinil gvajakol, s udjelom od 0,3%.

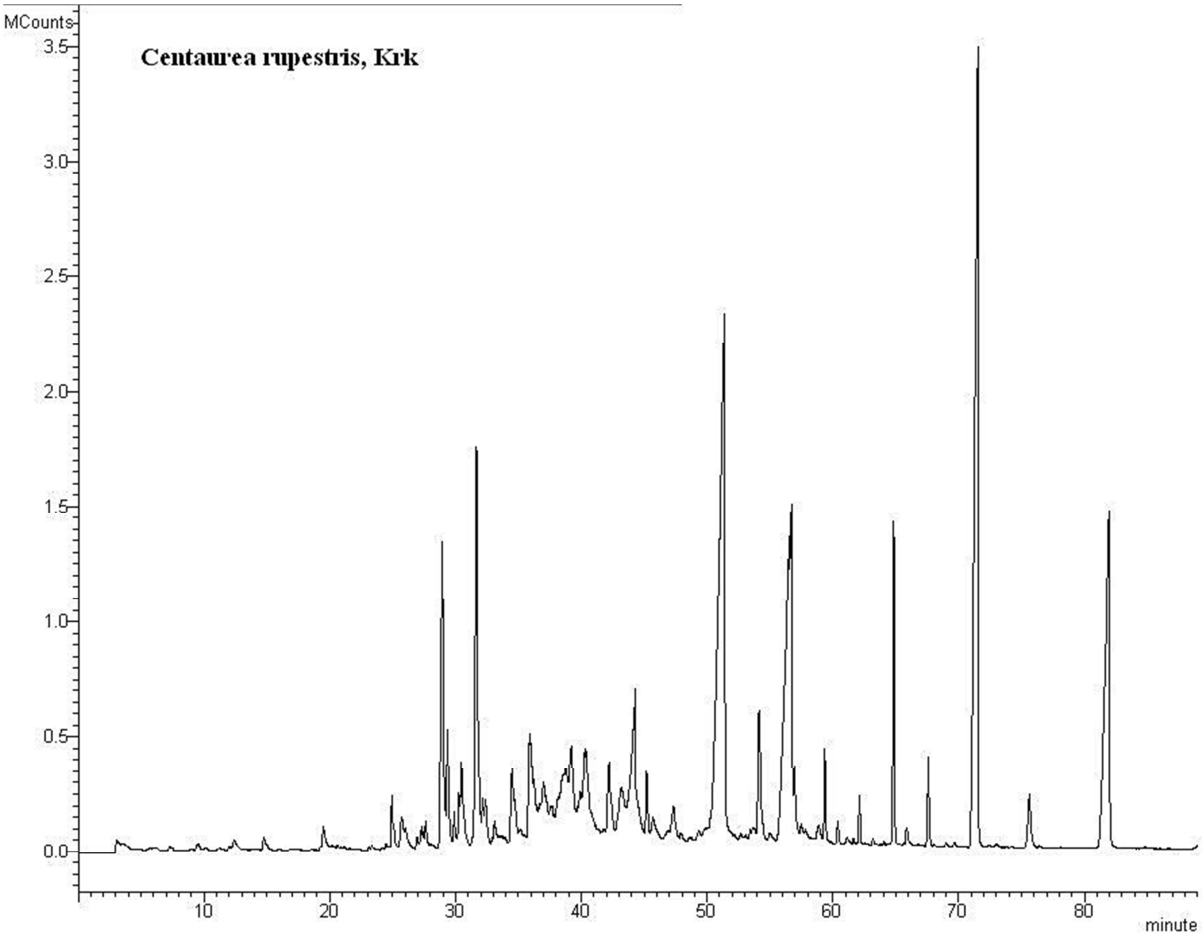
Heksadekanska kiselina (26,1%), α-linolenska kiselina (17,9%), germakren D (15,3%) i heptakozan (8,1%) te nonakosan (5,8%) najzastupljenije su komponente eteričnog ulja *C. solstitialis*, Marjan, Split.



Slika 4.12. Kromatogrami ukupne ionske struje eteričnog ulja izoliranog iz *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6)



Slika 4.13. Kromatogrami ukupne ionske struje eteričnog ulja izoliranog iz *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (8)



Slika 4.14. Kromatogrami ukupne ionske struje eteričnog ulja izoliranog iz *C. rupestris*, Krk

Sastav eteričnih ulja izoliranih iz vrste *Centaurea rupestris* s triju lokaliteta – Malačke (6) i (8) na Kozjaku te s otoka Krka – prikazan je u **tablici 7.** Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja *C. rupestris* sa svih triju lokaliteta prikazan je na **slikama 4.12–4.14**.

Na lokalitetu Malačka na Kozjaku sabrane su dvije populacije vrste *C. rupestris*, označene brojem 6 i 8. Vrste u ovim populacijama morfološki su se razlikovale, pa su stoga napravljena citogenetska i fitokemijska istraživanja kako bismo utvrdili radi li se zaista o dvjema različitim vrstma. Citogenetskim je metodama utvrđeno da se ne radi o dvjema različitim vrstama, već o istoj vrsti, a razlike u sastavu eteričnog ulja prikazane su u **tablici 4.4**.

Tablica 4.4. Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja *Centaurea rupestris*

	Naziv komponente	*C. rupestris* Kozjak, Malačka (6)	*C. rupestris* Kozjak, Malačka (8)	*C. rupestris* otok Krk	KI	Način identifikacije
	Terpenski spojevi	**55,1%**	**70,3%**	**29,3%**		
	Neoksidirani Monoterpeni	**-**	**-**	***tr***		
1.	*α*-pinen	-	-	tr	930	KI, MS
	Oksidirani monoterpeni	**-**	***0,9***	**-**		
2.	linalool	-	0,7	-	1004	KI, MS
3.	*α*-terpineol	-	0,2	-	1209	KI, MS
	Neoksidirani Seskviterpeni	***36,4***	***47,8***	***16,2***		
4.	bicikloelemen	0,6	1,7	0,6	1328	KI, MS
5.	*δ*-elemen	-	0,9	-	1340	KI, MS
6.	*ß*-ilangen	-	-	0,3	1362	KI, MS
7.	*ß*-elemen	-	0,5	0,4	1391	KI, MS
8.	*ß*-kariofilen	5,0	8,9	4,1	1416	KI, MS
9.	*α*-kalaren	-	-	1,1	1426	KI, MS
10.	*ß*-kopaen	1,4	2,6	-	1429	KI, MS
11.	*γ*-elemen	-	-	0,4	1437	KI, MS
12.	*cis*-*ß*-farnezen	0,6	0,9	0,5	1442	KI, MS
13.	*β*-kalaren	1,3	3,3	1,5	1451	KI, MS
14.	*α*-humulen	1,8	0,5	-	1456	KI, MS
15.	*trans*-*ß*-farnezen	-	-	-	1478	KI, MS
16.	*γ*-muurolen	0,1	-	-	1475	KI, MS
17.	germakren D	24,3	27,6	5,4	1482	KI, MS
18.	pačulen	-	-	0,5	1488	KI, MS
19.	biciklogermakren	0,6	0,2	0,9	1495	KI, MS
20.	germakren A	0,3	0,4	-	1507	KI, MS
21.	*γ*-kadinen	0,4	0,3	0,5	1519	KI, MS
	Oksidirani seskviterpeni	***12,0***	***12,6***	***10,5***		
22.	spatulenol	2,8	4,5	3,9	1568	KI, MS
23.	humulen-epoksid II	0,4	0,8	-	1608	KI, MS
24.	izospatulenol	1,1	0,5	-	1635	KI, MS
25.	*τ*-muurolol	0,6	-	-	1652	KI, MS
26.	7-*epi*-*α*-eudezmol	1,8	2,1	-	1660	KI, MS
27.	aromadendren-oksid	1,1	0,5	2,5	1671	KI, MS
28.	*α*-bisabolol	3,2	3	4,1	1684	KI, MS

29.	α-ciperon	1	1,2	-	1762	KI, MS
	Oksidirani diterpeni	***6,7***	***9,0***	***2,6***		
30.	fitol	6,7	9,0	2,6	2115	KI, MS
	Neterpenski spojevi	**40,0%**	**27,7%**	**63,5%**		
	Ugljikovodici	***30,1***	***9,0***	***28,0***		
31.	heptadekan	-	0,5	-	1700	KI, MS
32.	oktadekan	0,4	-	-	1800	KI, MS
33.	trikosan	2,0	1,2	1,1	2300	KI, MS
34.	tetrakosan	1,7	0,5	1	2400	KI, MS
35.	pentakosan	4,5	1,4	2,5	2500	KI, MS
36.	heksakosan	2,4	0,4	0,9	2600	KI, MS
37.	heptakosan	14,4	3,4	13,8	2700	KI, MS
38.	oktakosan	0,6	tr	0,9	2800	KI, MS
39.	nonakosan	4,1	1,6	7,8	2900	KI, MS
	Alkoholi	***tr***	***1,9***	***-***		
40.	oktanol	tr	1,9	-	1068	KI, MS
	Aldehidi	***tr***	***tr***	***0,6***		
41.	heksen-2-al	-	tr	-	868	KI, MS
42.	2-fenilacetaldehid	tr	tr	0,3	1045	KI, MS
43.	nonanal	-	-	0,3	1102	KI, MS
	Ketoni	***4,6***	***6,4***	***3,3***		
44.	3-okso-ß-Ionon	-	2,1	1,4	1671	KI, MS
45.	6,10,14-trimetil 2-pentadekanon	-	0,7	-	1850	KI, MS
	Kiseline	***5,3***	***10,4***	***31,6***		
46.	heksadekanska kiselina	3,2	8,8	18,7	1982	KI, MS
47.	α-linolenska kiselina	1,7	1,6	11,8	2169	KI, MS
48.	oktadekanska kiselina	0,4	-	1,1	2198	KI, MS
	Esteri	***-***	***-***	***-***		KI, MS
49.	2-heksenil-benzoat		0,4	-	1587	KI, MS
50.	metil-tetradekanoat	1,7	-	-	1727	KI, MS
51.	benzil-benzoat	2,9	3,2	1,9	1765	KI, MS
	UKUPNO	**95,1**	**98,0**	**97,8**		

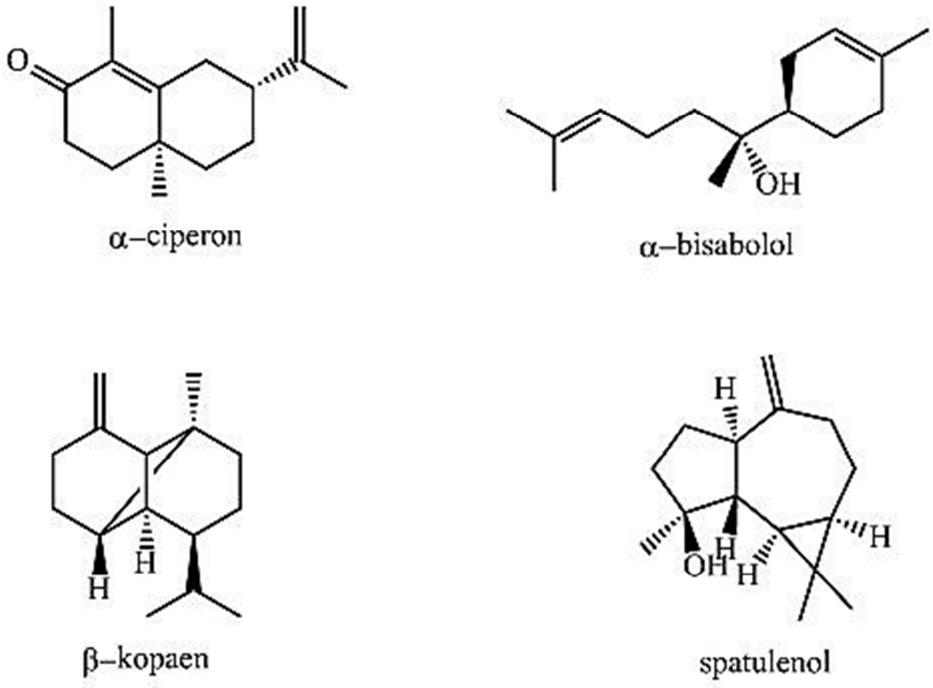
KI = Kovačev indeks, određen na HP-5MS koloni korištenjem homologne serije *n*-alkana; tr = tragovi (< 0,1 %); MS = identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara *NIST02* i *Wiley 7*.

U eteričnim uljima izoliranim iz *Centaurea rupestris* identificirana je ukupno 51 različita komponenta, u eteričnom ulju *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6), identificiraa su 32 spoja, u eteričnom ulju *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (8), identificirano je 38 spojeva, u eteričnom ulju *C. rupestris*, Krk, 36 spojeva.

Terpenski spojevi dominantni su spojevi, s udjelima od 55,1% i 70,3% za eterična ulja *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6) i (8), dok su kod eteričnog ulja *C. rupestris*, Krk, zastupljeni s udjelom od 29,3% i nisu dominantna skupina spojeva.

U eteričnom ulju *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6), monoterpenski spojevi nisu identificirani, kod eteričnog ulja *C. rupestris*, Krk, nalaze se u tragovima, dok se kod *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (8), nalaze u ukupnom udjelu od 0,9% s oksidiranim monoterpenima linaloolom i α-terpineolom.

Među terpenskim spojevima (**slika 4.15**) neoksidirani seskviterpeni najzastupljeniji su u svim trima istraživanim eteričnim uljima, s udjelima od 36,4%, 47,8% i 16,2%, dok su oksidirani seskviterpeni zastupljeni s udjelima od 12,0%, 12,6% i 10,5%.

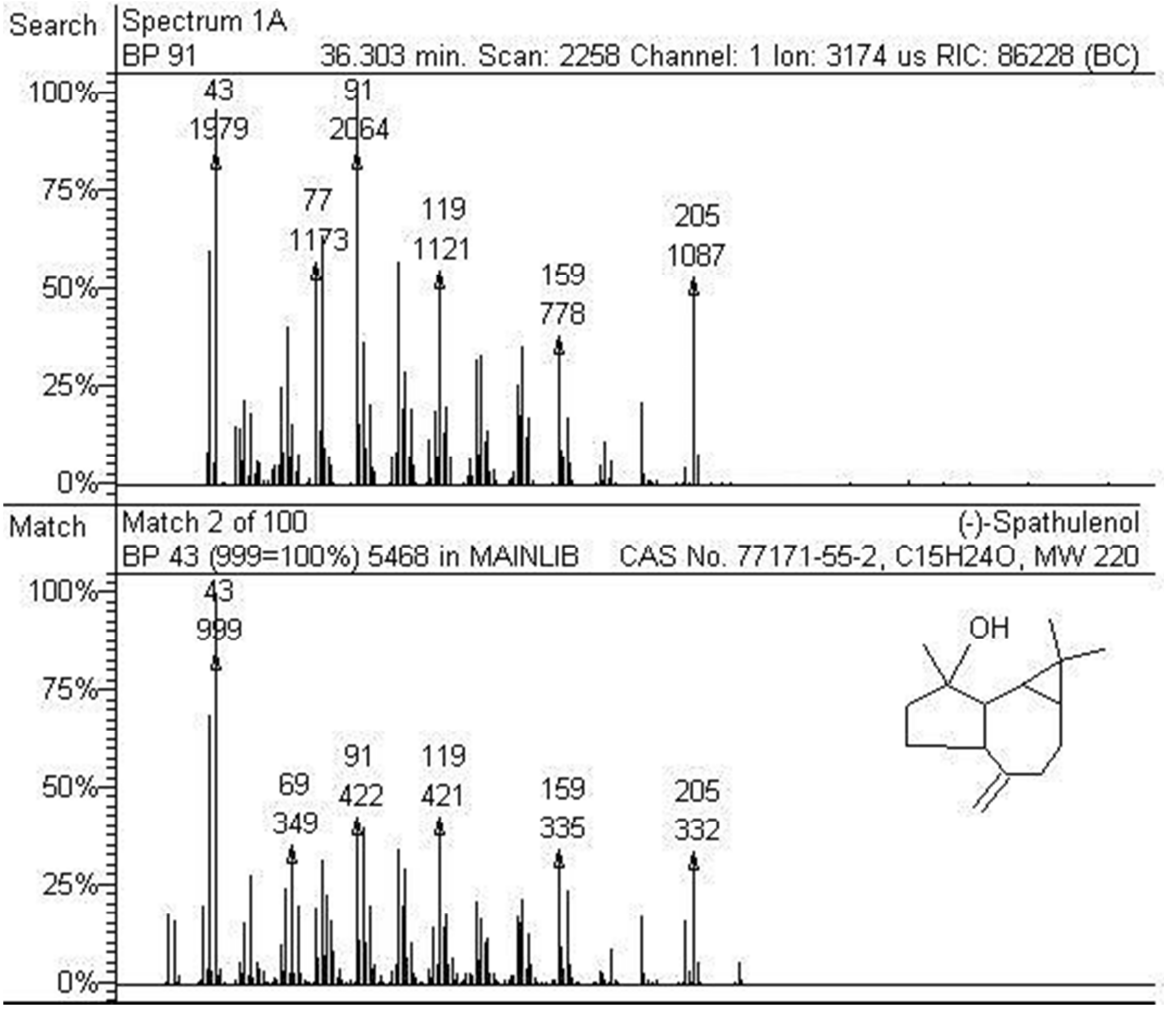


Slika 4.15. Neki od seskviterpenskih spojeva identificiranih u eteričnom ulju *Centaurea rupestris*.

Germakren D dominantan je seskviterpen eteričnih ulja vrsta sa svih triju lokaliteta, s udjelima od 24,3%; 27,6% i 4,3%, te je u eteričnim uljima *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6) i

(8), predstavljao i najzastupljeniju komponentu. Slijedi ga *β*-kariofilen, s udjelima od 5%, 8,9% i 4,1%.

Od oksidiranih seskviterpena u svim trima istraženim uljima kao najzastupljeniji je identificiran *α*-bisabolol, s udjelima od 3,2%, 3,0% i 4,1%. S nešto manjim udjelima, od 2,8%, 4,5% i 3,9%, zastupljen je spatulenol (**slika 4.16**). Diterpeni su u svim trima navedenim eteričnim uljima zastupljeni samo s alkoholom fitolom, s udjelima od 6,7% 9,0% i 2,6%.



Slika 4.16. Identifikacija spatulenola pomoću spektra masa

Kod eteričnog ulja izoliranog iz *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6) i (8), neterpenski su spojevi zastupljeni s udjelima od 40,0% i 27,7%, dok kod eteričnog ulja *C. rupestris*, Krk, predstavljaju dominantnu skupinu spojeva, s udjelom od 63,5%.

U eteričnom ulju izoliranom iz *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6), najzastupljeniji su neterpenski spojevi ugljikovodici (30,1%), slijede kiseline (5,3%) i ketoni (4,6%), dok su alkoholi i aldehidi prisutni samo u tragovima, a esteri nisu identificirani. Od ugljikovodika su najzastupljeniji heptakosan (14,4%) i pentakosan (4,5%), od ketona je najzastupljeniji benzil-benzoat (2,9%), a od kiselina je najzastupljenija heksadekansa kiselina (3,2%).

U eteričnom ulju izoliranom iz *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (8), najzastupljeniji su neterpenski spojevi kiseline (10,4%), slijede ugljikovodici (9,0%), ketoni (6,4%) i alkoholi (1,9%), dok su aldehidi prisutni samo u tragovima, a esteri nisu identificirani. Od kiselina je najzastupljenija heksadekansa kiselina (8,8%), od ugljikovodika su najzastupljeniji heptakosan (3,4%) i nonakosan (1,6%), od ketona je najzastupljeniji benzil-benzoat (3,2%), a od alkohola je prisutan samo oktanol (1,9%).

U eteričnom ulju izoliranom iz *C. rupestris*, Krk, najzastupljeniji su neterpenski spojevi kiseline (31,6%), slijede ugljikovodici (28,0%), aldehidi (4,0%), ketoni (3,7%), dok esteri i alkoholi nisu identificirani. Od kiselina je najzastupljenija heksadekansa kiselina (18,7%) dok je α-linolenska kiselina bila zastupljena s udjelom od 11,8%. Od ugljikovodika su najzastupljeniji heptakosan (13,8%) i nonakosan (7,8%), od aldehida je najzastupljeniji tetradekanal (1,9%), a od ketona je najzastupljeniji benzil-benzoat (1,9%).

Germakren D (24,3%), heptakozan (14,4%), fitol (6,7%), β-kariofilen (5,0%), pentakosan (4,5%) i nonakosan (4,1%) najzastupljenije su komponente eteričnog ulja *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6).

Germakren D (27,6%), fitol (9,0%), β-kariofilen (8,9%), heksadekanska kiselina (8,8%) i spatulenol (4,5%) najzastupljenije su komponente eteričnog ulja *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (8).

Heksadekanska kiselina (18,7%), heptakozan (13,8%), α-linolenska kiselina (11,8%) i nonakosan (7,8%%), germakren D (5,4), β-kariofilen (4,1%) i α-bisabolol (4,1%) najzastupljenije su komponente eteričnog ulja *C. rupestris*, Krk (**slika 4.15**).

Kao dominantne komponente proučavanih ulja uočavaju se neoksidirani seskviterpeni oksidirani seskviterpeni te neterpenske kiseline i ugljikovodici (**tablica 4.5**).

Tablica 4.5. Pregled dominantnih komponenti eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Centaurea*

	C. ragusina Marjan, Split cvjetovi	***C. ragusina*** Marjan, Split listovi	***C. ragusina*** otok Vis	***C. solstitialis*** Marjan, Split	***C. rupestris*** Kozjak, Malačka (6)	***C. rupestris*** Kozjak, Malačka (8)	***C. rupestris*** otok Krk
Terpenski spojevi							
Seskviterpeni							
germakren D	**17,1%**	4,3%	2,8%	**15,3%**	**24,3%**	**27,6%**	5,4%
γ-muurolen	**17.9%**	3,2%	-	-	0,1%	-	-
β-kariofilen	6,6%	1,0%	1,0%	1,6%	**5,0%**	**8,9%**	4,1%
Oksidirani seskviterpeni							
izospatulenol	**4,8%**	**7,6%**	4,4%	-	1,1%	0,5%	-
α-bisabolol	3,6%	1,3%	-	-	**3,2%**	3,0%	4,1%
kariofilen-oksid	3,4%	2,2%	-	-	-	-	-
spatulenol	-	-	-	-	2,8%	**4,5%**	3,9%
Neterpenski spojevi							
Ugljikovodici							
tetrakosan	**4,9%**	-	0,1%	0,4%	1,7%	0,5%	1,0%
heptakosan	-	-	**11,7%**	**8,1%**	**14,4%**	3,4%	**13,8%**
nonakosan	-	-	5,5%	5,8%	4,1%	1,6%	**7,8%**
ciklookta-1,3-dien	4,6%	**13,6%**	-	-	-	-	-
Kiseline							
oktadek-9-enska kiselina	0,3%	**10,6%**	-	-	-	-	-
heksadekanska kiselina	0,8%	0,3%	**17,7%**	**26,1%**	3,2%	**8,8%**	**18,7%**
tetradekanska kiselina	0,2%	0,6%	**5,7%**	-	-	-	-
α-linolenska kiselina	-	-	3,5%	**17,9%**	1,7%	1,6%	**11,8%**
Ketoni							
acetofenon	0,4%	**10,3%**	**9,5%**	-	-	-	-

Na temelju prikazanih rezultata vidljivo je da svako eterično ulje *C. solstititalis* ima drugačiju 111kombinaciju i udjele dominantnih spojeva, koji se razlikuju i između eteričnih ulja iste vrste sabrane na drugom lokalitetu kao i između eteričnih ulja različitih vrsta.

U proučavanim eteričnim uljima odabranih vrstra roda *Centaurea* monoterpeni nisu bili prisutni ili su se nalazili u udjelima manjim od 1%, što je karakteristično za većinu eteričnih ulja vrsta roda *Centaurea*.[8]

Od diterpena u većini eteričnih ulja prisutan je diterpenski alkohol fitol. Identificiran je s udjelima od 0,2% do 9,0%. U eteričnom ulju izoliranom iz *C. ragusina*, Vis, nije identificiran.

Zanimljivo je uočiti da su seskviterpeni germakren D, *β*-kariofilen te heksadekanska kiselina identificirani u svim proučavanim eteričnim uljima vrsta roda *Centaurea* bilo kao dominantni spojevi bilo kao spojevi s manjim udjelima.

Germakren D dominantan je spoj u sastavu eteričnog ulja izoliranog iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split; *C. solstitalis*, Marjan, Split; *C. rupestris* s lokaliteta Kozjak, Malačka (6) i (8).

β-kariofilen dominantna je komoponenta u sastavu eteričnih ulja izoliranih iz *C. rupestris* s lokaliteta Kozjak, Malačka (6) i (8).

Heksadekanska kiselina dominantna je komponenta u sastavu eteričnih ulja izoliranih iz *C. ragusina*, Vis; *C. solstitalis*, Marjan, Split; *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (8) i *C. rupestris*, Krk.

Heptakozan je identificiran u pet od sedam proučavanih eteričnih ulja. U većini eteričnih ulja u kojima je pronađen predstavlja dominantnu komponentu, a to su eterična ulja izoliran iz *C. ragusina*, Vis; *C. solstitalis*, Marjan, Split; *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6), i *C. rupestris*, Krk. Nije pronađen u dvama eteričnim uljima izoliranim iz cvjetova i listova *C. ragusina*, Marjan, Split.

Ciklookta-1,3-dien, oktadek-9-enska kiselina i acetofenon prisutni su samo u sastavu eteričnog ulja izoliranog iz *C. ragusina*, Marjan, Split, te u eteričnom ulju izoliranom iz listova predstavljaju dominantne komponente.

Acetofenon je prethodno identificiran kao jedna od glavnih komponenti *C. tchihatcheffii* Fisch. i Mey., također endemičnom vrstom iz Turske.[113]

Eterična ulja endemične vrste *C. ragusina* imala su jedinstvenu kombinaciju dominantnih spojeva u sastavu eteričnog ulja. Oktadeka-9-enska kiselina prethodno je identificirana u eteričnom ulju *C. pannonica* i *C. jacea*, gdje je također predstavljala jednu od glavnih komponenti.[115]

Značajna je karakteristika eteričnog ulja *C. ragusina* i prisutnost ciklookta-1,3-diena u eteričnom ulja izoliranom iz cvijeća i lišća. Ovo je prvi put da je ova komponenta identifiirana u eteričnom ulja vrste roda *Centaurea*.

Budući da je eterično ulje vrste *C. ragusina* jedino dosa istraženo od vrsta iz sekcije *Carduiformes*, sastav toga eteričnog ulja nije bilo moguće usporediti sa sastavom eteričnog ulja vrsta iz iste sekcije. Rezultati prikazani u ovom doktorskom radu objavljeni su i predstavljaju prvo i jedino istraživanje sastava eteričnog ulja te vrste.[35]

Od proučavanih vrsta u ovom doktorskom radu najbolje je istražena vrsta *C. solstitialis.* Razlozi tome njezina su kozmopolitska rasprostranjenost i štete koje kao invazivna vrsta uzrokuje u poljoprivredi Sjedinjenih Američkih Država te njezina ljekovitost i korištenje njezinih pripravaka u etnomedicini.

Prethodno proučavana eterična ulja izolirana iz *C. solstitialis*, kao najzastupljenije komponente sadržavala su terpene svrstane većim dijelom u seskviterpene i oksidirane seskviterpene te monoterpene, kao i neterpenske spojeve, od kojih su značajni bili ugljikovodici i kiseline (**tablica 4.6**).

Tablica 4.6. Sadržaj dominantnih komponenti do danas istraženih eteričnih ulja *C. solstitialis* i ulja iz ovoga doktorskog rada

	Literaturni izvori								
	1986 Buttery	***1990 Binder***			***2006 Esmaeili i sur.***	***2008 Senatore i sur.***	***2013 Kilić***	***2013 Lograda i sur.***	*C. solstitialis* Marjan, Split
		pup	***cvijet***	***list***					
Terpenski spojevi									
Monoterpeni									
1,8cineol	-	-	-	-	**9,6%**	-	-	-	-
Seskviterpeni									
α-kopaen	0,3%	**1,1%**	**2,5%**	0,4%	0,4%	-	-	0,4%	0,5%
ciklosativen	-	0,6%	**2,1%**	-	-	0,1%	-	-	-
germakren D	**61,0 %**	**11,6%**	**5,6%**	**12,7%**	2,4%	1,7%	**6,3%**	1,7%	**15,3%**
biciklogermakren	**7,2%**	0,8%	0,3%	**1,5%**	-	-	**14,4%**	-	0,8%
β-kariofilen	**4,3%**	1,1%	**1,4%**	**0,6%**	**6,2%**	1,2%	5,3%	0,4%	1,6%
ß-farnezen	0,6%	0,1%	0,2%	**0,7%**	-	-	0,9%	-	-
Oksidirani seskviterpeni									
spatulenol	-	-	-	-	1,1%	-	**11,3%**	-	-
kariofilen-oksid	-	-	-	-	**25,2%**	1,5%	5,2%	5,0%	-
β-eudezmol	-	-	-	-	-	0,4%	**15,5%**	2,5%	-
Neterpenski spojevi									
Ugljikovodici									
pentadeken	**4,9%**	**4,9%**	1,6%	0,2%	-	-	-	-	-
trikosan	-	-	-	-	-	2,9%	0,4%	**10,5%**	2,3%
pentakosan	-	-	-	-	-	5,2%	0,3%	**5,6%**	2,0%
heptakosan	-	-	-	-	-	**7,7%**	-	-	**8,1%**
nonacosan	-	-	-	-	-	**5,6%**	0,5%	-	5,8%
heikozan	-	-	-	-	-		-	**17,3%**	-
Kiseline									
heksadekanska kiselina	-	-	-	-	**30,8%**	**29,4%**	4,1%	**12,8%**	**26,1%**
α-linolenska kiselina	-	-	-	-	-	-	-	-	**17,9%**
(Z, Z)-oktadeka-9,12-dienska kiselina	-	-	-	-	-	**4,9%**	-	-	-

U prvim godinama istraživanja eteričnih ulja *C. solstitialis* s područja Sjedinjenih Američkih Država kao dominantne identificirane su seskviterpenske komponente, od koji je germakren D bio najzastupljeniji.[97, 98] Eterično ulje izolirano iz *C. solstitialis* koje je proučavao Buttery (1986) kao dominantne komponente sadržavalo je germakren D (61,0%), biciklogermakren (7,2%), pentadeken (4,9%) i *β*-kariofilen (4,3%).

Binder (1990) proučavao je sastav eteričnog ulja *C. solstitialis* izoliranog iz pupa, cvijeta i lista. Sva tri eterična ulja imala su različitu kombinaciju i udjele dominantnih spojeva. U eteričnom ulju izoliranom iz pupa dominantne komponente su germakren D (11,6%), pentadeken (4,9%), nepoznati seskviterpen (4,4%) i α-kopaen (1,1%). U ulju izoliranom iz cvijeta dominantne komponente su germakren D (5,6%), α-kopaen (2,5%), ciklosativen (2,1%) i β-kariofilen (1,4%). U eteričnom ulju izoliranom iz lista dominantne komponenete su germakren D (12,7%), biciklogermakren (1,5%), β-farnezen (0,7%) i β-kariofilen (0,6%).

Eterično ulje izolirano iz *C. solstitialis* iz Irana sadrži podjednako zastupljene seskviterpene i neterpenske spojeve, a kao dominantne komponente sadrži heksadekansku kiselinu (30,8%), kariofilen-oksid (25,2%), β-kariofilen (6,2%) i 1,8-cineol (9,6%).[14]

Eterično ulje te vrste iz Italije sadrži najvećim udijelom zastupljene neterpenske spojeve, ugljikovodike i kiseline, a kao dominantne komponente sadrži heksadekansku kiselinu (29,4%), heptakosan (7,7%), nonakosan (5,6%) i (*Z*,*Z*) oktadeka-9,12-diensku kiselinu (4,9%).[106]

Kilić (2013) je u sastavu eteričnog ulja ove vrste iz Turske kao dominantne spojeve identificirao seskviterpenekse spojeve: β-eudezmol (15,5%), biciklogermakren (11,3%), spatulenol (11,3%) i germakren D (6,3%).

Lograda i sur. (2013) u eteričnom su ulju te vrste iz Alžira s najvećim udijelom identificirali neterpenske ugljikovodike i kiseline, i to s heikosanom (17,3%), heksadekanskom kiselinom (12,8%), trikosanom (10,5%) i pentakosanom (5,6%) kao dominantnim komponentama.

Germakren D identificiran je u svim dosad proučavanim eteričnim uljim *C. solstitialis*, a kao dominantna komponenta nalazi se sastavu eteričnog ulja *C. solstitialis* iz ovoga doktorskog rada (15,3%) i u većini dosad istraživanih ulja te vrste.

β-kariofilen također je prisutan u svim dosad istaživanim eteričnim uljima *C. solstitialis*, i to u rasponima od 0,6% do 6,2% te je u većini istraživanih ulja ove vrste bio među dominantnim komponentama.

U sastavu eteričnih ulja vrsta roda *Centaurea* među dominantnim komponentamaidentificirani su neterpenski spojevi, ugljikovodici i masne kiseline, koji inače čine glavne konstituente epikutikularnih voskova.[106]

U novim istraživanjima sastava eteričnog ulja te vrste neterpenski ugljikovodici i kiseline, identificirani su kao dominantne komponente. Eterična ulja *C. solstitialis* koja su proučavali Esmaeili i sur. (2006), Senatore i sur. (2008) te Lograda i sur. (2013) kao dominantne spojeve sadrže neterpenske spojeve. U trima od četiriju istraživanja kao dominantan spoj u sastavu eteričnog ulja *C. solstitialis* identificirana je heksadekanska kiselina s udjelima od 30,8% kod Esmaeili i sur. (2006), 29,4% kod Senatore i sur. (2008) i 12,8% u istraživanju od Lograda i sur. (2013). U ovom doktorskom radu heksadekanska je kiselina među dominantnim spojevoma (26,1%).

Usporedbom kemijskog sastava i sadržaja pojedinih komponenti eteričnog ulja *C. solstitialis* uočava se prisutnost germakrena D i heksadekanske kiseline među dominantnim komponentama svih ulja. Zanimljivo je uočiti da su seskviterpeni germakren D, *β*-kariofilen te heksadekanska kiselina identificirani u svim proučavanim eteričnim uljima vrsta roda *C. solstitialis* bilo kao dominantni spojevi bilo s manjim udjelima. Svi navedeni spojevi nalaze se i u sastavu eteričnog ulja *C. solstitialis* istraživanog u ovom doktorskom radu.

Dosad je objavljeno jedno istraživanje sa sastavom eteričnog ulja *C. rupestris* iz Italije (Tava, 2010). Dominantni spojevi u sastavu tog eteričnog ulja bili su germakren D (42,3%) i *β*-kariofilen (8,0%), koji su prisutni i među dominantnim spojevima eteričnih ulja *C. rupestris* istraživanih u ovom doktorskom radu. Osim tih spojeva dominantne komponente već istraženog eteričnog ulja *C. rupestris* su *β*-faznezen (8,3%) i *α*-farnezen (5,2%), koji nisu identificirani u sastavu eteričnih ulja istraživanih u ovom doktorskom radu. Zanimljivo je uočiti da ugljikovodici i kiseline u već istraženom eteričnom ulju *C. rupestris* nisu bili prisutni, a ako jesu, udjeli su bili vrlo mali, od 0,2% do 0,6%.

Proučavanjem sastava eteričnih ulja na primjeru *C. ragusina* uočeno je da veći udio seskviterpenskih spojeva imaju eterična ulja izolirana iz cvjetova, dok eterična ulja izolirana iz listova imaju veći udio ugljikovodika i kiselina. Slično zapažanje nalazimo i kod sastava eteričnog ulja *C. aeolitica* i *C. tchihatcheffii*.[98, 119, 121] To je vjerojatno objašnjenje sastava eteričnog ulja *C. rupestris* s otoka Krka, s obzirom na to da se sakupljeni materijal sastojao od vrlo malog udjela cvjetova.

Seskviterpenski ugljikovodik germakren D često je dominantna komponenta eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, što se pokazalo i ovim doktorskim radom.[98-135]

Germakren D, *β*-kariofilen te heksadekanska kiselina identificirani su u svim proučavanim eteričnim uljima vrsta roda *Centaurea* bilo kao dominantni spojevi bilo s manjim udjelima. Prisutnost ovoga spoja važna je u botaničkoj kemotaksonomiji i kod dvojbenih vrsta može imati ključnu ulogu u taksonomskom određivanju.[8, 19]

Sastav istraženih eteričnih ulja može pridonijeti boljoj taksonomiji navedenih vrsta ili drugih vrsta za koje postoji dvojba kojim taksonomskim razredima pripadaju. Iako se sastav eteričnog ulja kod pojedine vrste razlikuje s obzirom na lokalitet na kojem su sakupljene, ipak je zajedničko prisustvo karakterističnih spojeva koje prilikom određivanja pripadnosti vrste pojedinoj sekciji može imati ključnu ulogu.[8] Primjer za to je statitička analiza rezultata plinske kromatografije nekoliko *Centaurea* vrsta prilikom koje je potvrđena pripadnost *C. iconiensis* rodu Raphonticoides, za koju je postojala taksonomska dvojba koju je bilo teško razriješiti temeljem dostupnih botanilčkih kriterija. Prisustnost germakrena D i *β*-kariofilena imala je pri tom važnu ulgu. [8]

Osim boljoj klasifikaciji dobiveni podaci pridonose planiranju i provedbi mjera zaštite i očuvanja tih vrsta, prilikom čega je potrebno voditi računa i o njihovu evolucijskom putu kao i njihovim genetskim odlikama.

4.3. Biološki potencijal hlapljivih spojeva biljaka roda *Centaurea*

Biološki potencijal eteričnih ulja roda *Centaurea* u ovom doktorskom radu ispitan je u smislu određivanja antioksidacijskog potencijala, inhibicije kolinesteraza i antimikrobnog djelovanja. Biološka aktivnost određena je za eterična ulja vrste *Centaurea ragusina* s otoka Visa, *Centaurea solstitialis* s brda Marjan u Splitu, *Centaurea rupestris* s lokaliteta Malačka (6) na brdu Kozjak.

Korištene antioksidacijske metode bile su FRAP i DPPH, a rezultati antioksidacijskog potencijala uspoređeni su s poznato dobrim antioksidansima poput vitamina C i BHA te poznatim antibioticima i antimikoticima.

Za testiranje inhibicije enzima AChE i BChE hlapljivim spojevima biljaka roda *Centaurea* korištena je metoda po Ellmanu, a rezultati inhibicije tih enzima eteričnim uljima uspoređeni su s poznato dobrim inhibitorima kolinesteraza takrinom i eserinom.

Antimikrobni učinak određen je metodom disk-dilucije i metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije. Rezultati antimikrobnog djelovanja eteričnih ulja uspoređeni su s poznato dobrim antibioticima gentamicinom i cefatoksimom te antimikotikom amfotericinom.

4.3.1. Antioksidacijski potencijal hlapljivih spojeva biljaka roda Centaurea

Antioksidacijski potencijal hlapljivih spojeva biljaka roda *Centaurea* ispitan je metodama mjerenja redukcijskog potencijala uzoraka (FRAP-metoda) i uklanjanja slobodnog radikala (DPPH), a obje su metode opisane u poglavlju 3.7. Rezultati dobiveni mjerenjem aktivnosti uzorka eteričnog ulja koncentracije 1 g/L uz pomoć FRAP-metode izraženi su kao ekv. mmol Fe^{2+}/L, dok su za DPPH-metodu izraženi kao postotak inhibicije DPPH-radikala.

Rezultati dobiveni testiranjem antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Centaurea* i odgovarajućih poznato dobrih antioksidansa prikazani su u **tablici 4.7.**

Tablica 4.7. Antioksidacijski potencijal hlapljivih spojeva biljaka roda *Centaurea*

	FRAP	**DPPH**
	(ekv. mmol Fe^{2+}/L)	**(% inhibicije)**
Centaurea ragusina, otok Vis	26,2	12,1
Centaurea solstitialis, Marjan, Split	38,7	11,9
Centaurea rupestris Kozjak, Malačka (6)	26,2	8,1
BHA	4864,6	95,1
vitamin C	4863,9	96,4

*testirana masena konc. iznosila je 1g/L

Eterična ulja izolirana iz vrsta roda *Centaurea* početne koncentracije 1 g/L (0,033 g/L u reakcijskom sustavu), testirana FRAP-metodom, pokazala su redukcijski potencijal kako slijedi: za *C. ragusina*, Vis, 26,2 ekv. mmol Fe^{2+}/L; *C. solstitalis*, Marjan, Split, 38,6 ekv. mmol Fe^{2+}/L i *C. rupestris* Kozjak, Malačka (6), 26,2 ekv. mmol Fe^{2+}/L. Otopine poznato dobrih antioksidansa BHA i vitamina C u istoj koncentraciji pokazale su redukcijski potencijal od 4864,6 ekv. mmol Fe^{2+}/L.

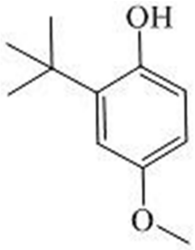
Eterična ulja izolirana iz vrsta roda *Centaurea* početne koncentracije 1 g/L (0,048 g/L u reakcijskom sistemu), testirana DPPH-metodom, pokazala su potencijal uklanjanja DPPH-radikala izražen kao postotak inhibicije DPPH· kako slijedi: *C. ragusina*, Vis, 12,11%; *C. solstitalis*, Marjan, Split, 11,9% i *C. rupestris* Kozjak, Malačka (6), 8,6%.

Otopine poznato dobrog antioksidansa BHA i vitamina C u istoj testiranoj koncentraciji pokazale su potencijal uklanjanja DPPH izražen kao postotak inhibicije kako slijedi: BHA 95,1% i vitamin C 96,4%.

Rezultati antioksidacijskog potencijala eteričnih ulja, dobiveni metodama FRAP i DPPH, mogli bi se kategorizirati kao slaba antioksidacijska aktivnost.

Poznato je da dobru antioksidacijsku aktivnost imaju fenolni spojevi koji imaju hidroksilnu skupinu vezanu na benzenski prsten. Primjer za to je antioksidans BHA, korišten u istraživanjima u ovom doktorskom radu. BHA ima dobru antioksidacijsku aktivnost, što se

pripisuje hidroksilnoj skupini vezanoj na aromatski prsten. Na aromatskom prstenu vezana *tert*-butilna skupina dodatno pridonosi antioksidacijskim svojstvima (**slika 4.17**).



Slika 4.17. Antioksidans butil-hidroksianizol

U reakciji BHA sa slobodnim radikalima odcjepljuje se proton iz hidroksilne skupine i dolazi do nastanka fenoksil-radikala, koji su stabilni i postojani. Njihova postojanost proizlazi iz činjenice da u benzenskom prstenu posjeduju delokalizirane elektrone te steričke smetnje u obliku *tert*-butilne skupine, a BHA posjeduje i dobro odlazeću metoksi-skupinu, koja pridonosi antioksidacijskoj aktivnosti.[177]

Kod određivanja antioksidacijske aktivnosti korištenjem DPPH-metode poznato je da aktivnost antioksidansa može ovisiti o ponašanju antioksidansa u reakciji s DPPH-radikalima. Razlikujemo antioksidanse s brzom reakcijskom kinetikom, poput vitamina C, i one sa srednjom reakcijskom kinetikom te sporom reakcijskom kinetikom, poput BHA. Razlike se očituju u vremenu koje je potrebno da antioksidansi ostvare stacionarno stanje s DPPH-radikalima. Na kinetiku tih reakcija utječu strukturne karakteristike antioksidansa, odnosno broj funkcionalnih hidroksilnih skupina raspoloživih za reakciju doniranja protona. Spojevi s dvjema hidroksilnim skupinama, poput vitamina C, reagiraju brže, dok je kod BHA uz hidroksilnu skupinu, koja može donirati vodik, prisutan i sterički utjecaj alkilnih skupina.[177]

Poznati spojevi koji dolaze u sastavu eteričnih ulja, a posjeduju dobru antioksidacijsju aktivnost su timol, karvakrol, eugenol i drugi. To su spojevi koji u svojoj građi imaju benzenski prsten s hidroksilnim skupinama, koje su zaslužne za dobru antioksidacijsku aktivnost ovih spojeva. Ti i takvi spojevi nisu evidentirani ili se nalaze u tragovima kao komponente u sastavu proučavanih eteričnih ulja istraživanih vrsta roda *Centaurea* u ovom doktorskom radu, što je vjerojatan razlog slaboj antioksidacijskoj aktivnosti njihovih eteričnih ulja.

4.3.2. Sposobnost inhibicije enzima kolinesteraza hlapljivim spojevima iz biljaka roda Centaurea

Od velikog interesa je pronaći prirodne spojeve koji dobro inhibiraju acetilkolinesteraze i imaju dobra antioksidacijska svojstva u svrhu liječenja bolesti poput Alzheimerove demencije. Budući da eterična ulja sadržavaju lipofilne molekule, a male lipofilne molekule lako mogu proći krvno-moždanu barijeru, eterična ulja mogu biti dobar izvor inhibitora kolinesteraza.

Sposobnost inhibicije enzima kolinesteraza (AChE i BChE) eteričnim uljima odabranih vrsta roda *Centaurea* testirana je Ellmanovom metodom, opisanom u poglavlju 3.7. Dobiveni rezultati za eterična ulja početne koncentracija 1 g/L uspoređeni su s poznato dobrim inhibitorima takrinom i eserinom, iste testirane koncentracije.

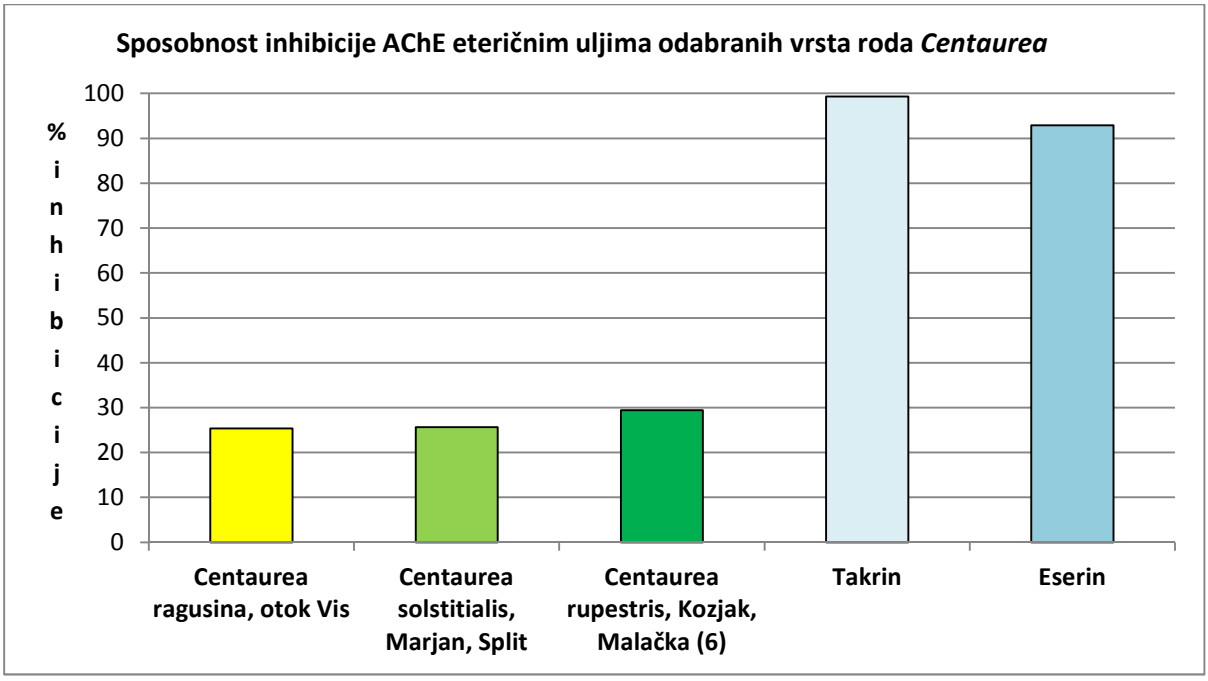
Sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze eteričnim uljima odabranih vrsta roda *Centaurea* prikazana je na **slici 4.18**, a sposobnost inhibicije butirilkolinesteraze uljima odabranih vrsta roda *Centaurea* na **slici 4.19**.

Eterična ulja biljaka roda *Centaurea* početne koncentracije 1 g/L (0,045 g/L u reakcijskom sustavu) pokazala su inhibiciju acetilkolinesteraze kako slijedi: *C. ragusina* s otoka Visa 25,3%; *C. solstitalis* Marjan, Split, 25,6% i *C. rupestris* Kozjak, Malačka (6), 29,4%.

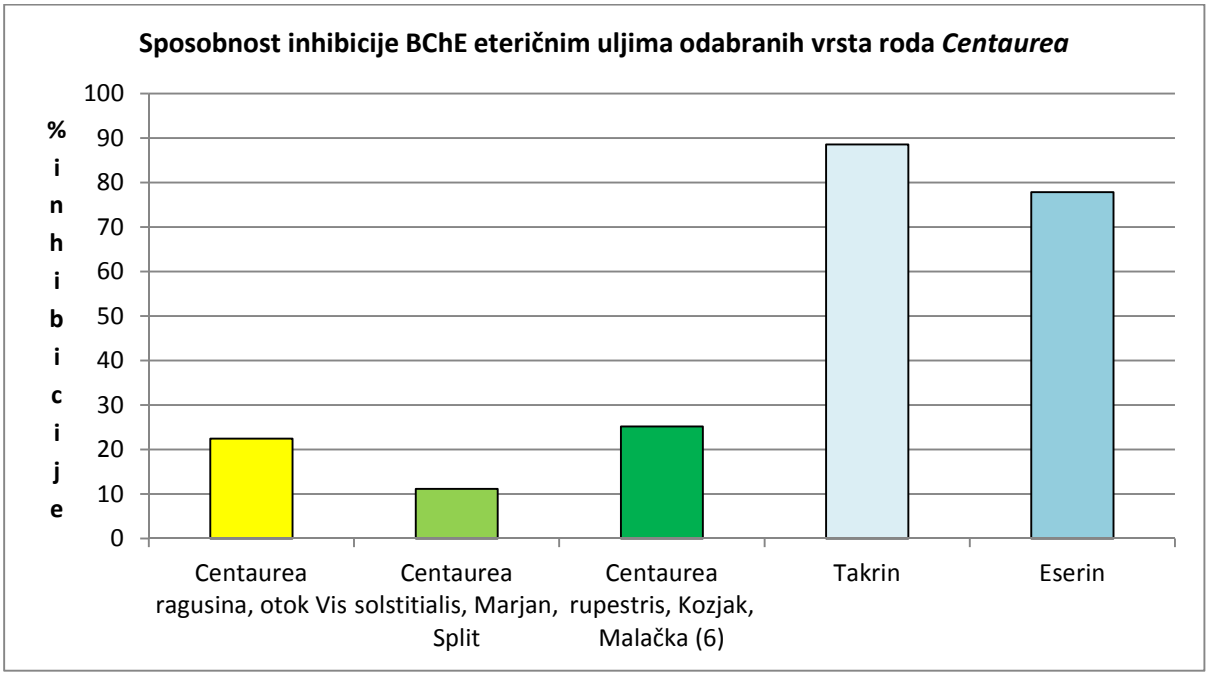
Poznato dobar inhibitor takrin pokazao je inhibiciju od 99,3%, a eserin 92,9% inhibicije pri istoj koncentraciji od 1 g/L (0,045 g/L u reakcijskom sistemu).

Sva ispitivana eterična ulja pokazala su slabu inhibiciju acetilkolinesteraze u usporedbi s poznato dobrim inhibitorima takrinom i eserinom, iste testirane koncentracije.
Eterična ulja biljaka roda *Centaurea* početne koncentracije 1 g/L, testirana Ellmanovom metodom, pokazala su inhibiciju butirilkolinesteraze izraženu kao postotak kako slijedi: *C. ragusina* s otoka Visa 22,5%; *C. solstitalis* Marjan, Split, 11,2% i *C. rupestris* Kozjak, Malačka (6), 25,2%.

Inhibitor takrin pokazao je 88,6%, a eserin 77,9% inhibicije.



Slika 4.18. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze eteričnim uljima odabranih vrsta roda *Centaurea*

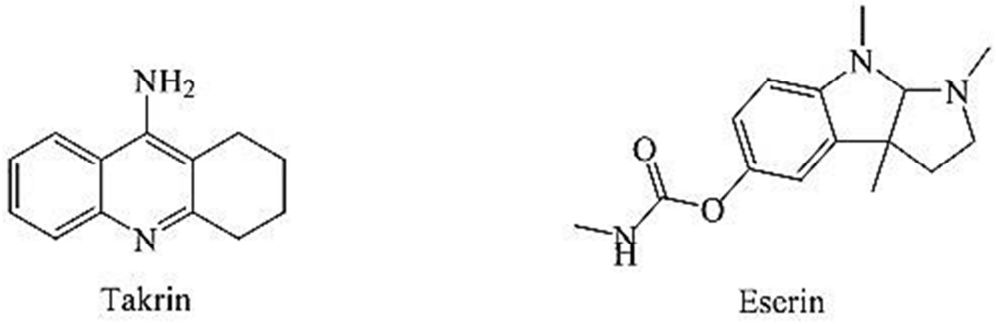


Slika 4.19. Sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze eteričnim uljima odabranih vrsta roda *Centaurea*

Sva ispitivana eterična ulja pokazala su slabu inhibiciju butirilkolinesteraze u usporedbi s poznato dobrim inhibitorima takrinom i eserinom, iste testirane koncentracije (**slika 4.20**).

Eserin ili fizostigmin bio je prvi pronađeni, a kasnije i sintetizirani inhibitor kolinesteraza koji se proučavao u svrhu liječenja Alzheimerove bolesti. To je karbamat koji je izoliran iz sjemenki biljke *Physostigma venenosum*. Ireverzibilni je inhibitor koji karboamilira katalitički serin AChE, ali spontana je dekarbamoilacija relativno brza reakcija. Ima snažan terapeutski učinak, no zbog neugodnih nuspojava umjesto njega se danas koriste drugi terapeutici s blažim nuspojavama.[156,164]

Takrin se je prvi komercijalni lijek koji se koristi u liječenju Alzheimerove bolesti. Djeluje kao reverzibilni inhibitor acetilkolinesteraze. Ima snažan terapeutski učinak i na AChE i BChE, zbog čega je i njegova toksičnost velika, te se danas zamjenjuje inhibitorima kolinesteraza koji imaju blaže nuspojave.[156, 164]



Slika 4.20. Inhibitori kolinesteraza takrin i eserin

Inhibitori kolinesteraza mogu se podijeliti na ireverzibilne i reverzibilne, dakle one koji se vežu na katalitičko mjesto ili unutar aktivnog mjesta nekovalentnim reakcijama. Reverzibilni inhibitori vežu se nekovalentnim interakcijama, dok se ireverzibilni vežu kovalentno za serin u katalitičkoj trijadi. [155, 156]

Aktivno mjesto obaju enzima kolinesteraza, AChE i BChE, dugačko je 20Å i široko 5Å, što utječe na veličinu biološki aktivnih spojeva koji se mogu vezati na aktivno mjesto tih dvaju enzima. Inhibicija enzima može biti posljedica: a) konformacijske promjene enzima uzrokovane vezanjem inhibitora, b) elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih inhibitora s kationskim dijelom supstrata tijekom katalitičke reakcije ili c) steričkih i/ili elektrostatskih

smetnja ulasku supstrata u aktivni centar enzima. Raspored aminokiselina u aktivnom mjestu utječe na selektivnost inhibicije enzima AChE i BChE. [156, 187]

Prisutnost pozitivnog naboja i/ili aromatskih ili hidrofobnih supstituenata koji olakšavaju ulazak i smještanje inhibitora u aktivno mjesto zajednička je karakteristika svih dobrih inhibitora kolinesteraza. Postoje i dobri inhibitori, kod kojih manji dio molekule koji je pozitivno nabijen i može ući u aktivno mjesto, poput fascikulina, a veći dio molekule zbog steričkih smetnji ne može ući u aktivno mjesto. Inhibitori koji se mogu vezati na dva mjesta na enzimu u svojoj strukturi obično imaju dva aromatska prstena i dvije pozitivno nabijene molekule udaljene dovoljno da se jedna veže na kolinsko, druga na periferno mjesto, poput dekametonija.[156]

Butirilkolinesteraza može hidrolizirati neutralne, pa čak i neke negativno nabijene ligande poput aspirina, budući da njezino kolinsko mjesto nije specifično samo za pozitivno nabijene ligande. BChE manje je selektivna prema inhibitorima od AChE, pa stoga djeluje kao prirodno čistilo od spojeva koji inhibiraju AChE i time je štiti od inhibicije. Potvrđeno je i da male lipofilne molekule imaju veću tendenciju da inhibiraju AChE od BChE.[156,185]

Od dosad proučenih iz prirode izoliranih inhibitora kolinesteraza najznačajniji su alkaloidi i oni se najčešće reverzibilno vežu na aktivno mjesto. Posjeduju pozitivno nabijen dušikov atom, koji se stabilizira u kolinskom veznom mjestu. Osim dušika imaju još i dio molekule koji je lipofilnim dijelom odvojen od pozitivnog naboja i stvara vodikove veze sa serinskim i histidinskim ostacima oksianionske šupljine.[156]

Eterična ulja mogu sadržavati lipofilne molekule koje su dovoljno male da mogu lako proći krvno-moždanu barijeru te se inhaliranjem mogu brzo i jednostavno unijeti do ciljanog terapeutskog mjesta, zaobilazeći pritom probavni sustav, u kojem bi moglo doći do njihove degradacije i gubitka aktivnih inhibicijskih svojstava. [28, 184, 185]

Prisutnost različitih biološki aktivnih molekula u sastavu eteričnog ulja može dovesti do pojave antagonizma i sinergizma među pojedinim konstituentima eteričnog ulja, što može imati pojačavajući ili umanjujući inhibicijski efekt eteričnog ulja na kolinesteraze. Molekule u

sastavu eteričnog ulja mogu dinamički utjecati na dostupnost aktivnog mjesta za inhibitor te mogu imati sterički utjecaj na aktivno mjesto.

Zbog prisutnosti različitih molekula u sastavu eteričnih ulja moguće je donijeti vrlo malo općenitih zaključaka o inhibiciji eteričnog ulja na kolinesteraze. Iz istog je razloga teško dati i prijedlog o potencijalnim inhibitorima koji se nalaze u sastavu eteričnog ulja.

Kao prvi potencijalno dobri inhibitori kolinesteraza iz sastava eteričnih ulja pokazali su se monoterpenski spojevi. Eterično ulje kadulje u svom sastavu ima značajan udio monoterpena. Tako su 1,8-cineol i α-pinen pokazali dobru inhibicijsku aktivnost na AChE s IC_{50} = 0,67 mM i IC_{50} = 0,63 mM. U nekim istraživanjima ta su dva monoterpena pokazala značajan sinergistički učinak. [155, 184, 186, 188]

Osim njih su citral, 3-karen i karvon pokazali značajniju inhibiciju, dok su se 2-karen, kamfor i bornil-acetat pokazali kao slabi inhibitori.[155]

U istraživanju Politeo i sur. (2011) na inhibiciju AChE testirane su smjese enantiomera monoterpena α-pinena i β-pinena te su uspoređene sa smjesom eteričnog ulja crnog bora *Pinus nigra*, u čijem sastavu dominiraju dva navedena monoterpena. Eterično ulje pokazalo je značajniju inhibiciju AChE u odnosu na smjesu čistih spojeva, dok je smjesa enantiomera čistih spojeva α-pinena i β-pinena u omjeru 3 : 2 pokazala najviši potencijal inhibicije, veći od samih čistih spojeva.[34]

Monoterpeni timol (IC_{50} = 0,74) i karvakrol (IC_{50} = 0,063) pokazali su značajniju inhibiciju AChE, pri čemu je inhibicijska aktivnost karvakrola bila deset puta veća od njegova izomera timola. To upućuje na pretpostavku da položaj hidroksilne skupine kod tih dvaju spojeva ima značajnu ulogu u njihovoj aktivnosti i inhibiciji AChE.[28]

Fenilpropanski spojevi, građom slični monoterpenima karvakrolu i timolu, također su proučavani s obzirom na inhibiciju kolinesteraza. Kao potencijalni inhibitori kolinesteraza pokazali su se i sljedeći spojevi: skopoletin, skopolin, ftalidi, lingustilid, ksantotoksin i izopimpinelin.[157]

Osim njih su s obzirom na inhibiciju BChE istraživani su i galangin, apigenin, kemferol, kvercetin, miricetin, fisetin, luteolin i rutin. Pokazali su se kao reverzibilni inhibitori te je na bolju inhibiciju BChE utjecao broj hidroksilnih skupina vezanih na fenolni prsten. Hidroksilne skupine mogu stvarati vodikove veze u aktivnom mjestu enzima. Spoj koji ima manje hidroksilnih skupina bio je bolji inhibitor, pa je tako galangin bio znatno bolji inhibitor od rutina. Među navedenim spojevima postojala je selektivnost u inhibiciji između BChE i AChE, posebno značajna kod galangina, čak 12 puta veća u korist BChE.[187]

Općenito govoreći, monoterpenski spojevi pokazali su se kao potencijalno dobri inhibitori kolinesteraza. Ketonski monoterpeni pokazali su se kao bolji inhibitori kolinesteraza od alkoholnih monoterpena i ugljikovodika. U studijama koje uzimaju u obzir strukturu i aktivnost spojeva kod monoterpena koji u svojoj strukturi sadrže karanski ili pinenski prsten na bolju inhibiciju kolinesteraza utječe položaj dvostruke veze. Dihidrofuran je bio aktivniji u odnosu na furan zbog više flesksibilnosti prilikom vezanja na aktivno mjesto enzima. Policiklički spojevi koji svojim prstenom mogu ući u aromatsku petlju aktivnog mjesta kolinesteraza čine to na način da ulazi najprije prsten koji ili ima veći hidrofobni karakter ili povećanu elektropozitivnost.[155]

U literaturnim nalazima zabilježeno je samo jedno istraživanje inhibicije AChE i BChE eteričnim uljima vrsta roda *Centaurea*: *Centaurea lycopifolia*, *Centaurea balsamica* i *Centaurea iberica.*[127]

Inhibicije AChE za navedena ulja koncentracije 200 µg/mL bila su redom kako slijedi: 63,4 ± 0,2%; 44,9 ± 0,3 i 49,6 ± 0,1%, dok je inhibicija BChE za ista ulja iste koncentracije iznosila 65,8 ± 0,7%; 51,6 ± 0,3% i 58,9 ± 0,6%. Eterično ulje *C. lycopifolia* kao dominantne komponente sadržavalo je kariofilen-oksid (9,7%), spatulenol (7,3%), vidrol (4,3%) i α-pinen (4,0%). Eterično ulje *C. balsamita* kao dominantne komponente sadržavalo je α-selinen (8,5%), heksatriakontan (8,3%), 2,5 di-*tert*-oktil-*p*-benzokinon (7,4%) i tetrakosan (6,0%). Eterično ulje *C. iberica* kao dominantne komponente sadržavalo je arahidonsku kiselinu (25,3%), heksadekansku kiselinu (5,9%), kolnu kiselinu (5,5%) i izononan (5,0%).[127]

Seskviterpenski spojevi, zastupljeni u sastavu eteričnih ulja vrsta roda *Centaurea*, vrlo su slabo istraženi na inhibiciju kolinesteraza. Od spojeva koji se mogu naći u sastavu eteričnih ulja, a dosad su ispitani na inhibiciju acetilkolinesteraze, u sastavu eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Centaurea* u značajnijim udjelima nalaze se samo *β*-kariofilen i kariofilen-oksid.

Germakren D, seskviterpen koji je značajno zastupljen u eteričnim uljima *Centaurea*, nije komercijalno dostupan, pa stoga dosad nema literaturnih izvora o njegovoj inhibicijskoj aktivnosti na kolinesteraze.

β-kariofilen se pokazao kao bolji inhibitor AChE nego BChE, dok za kariofilen-oksid postoje samo literaturni podaci za inhibiciju BChE. *β*-kariofilen zastupljen je u eteričnom ulju *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6), i to eterično ulje pokazuje nešto bolju inhibiciju AChE nego BChE.

Općenito možemo reći da su sva ispitana eterična ulja odabranih vrsta roda *Centaurea* u ovom doktorskom radu pokazala slab inhibicijski potencijal, ali nešto bolji na AChE nego na BChE. Budući da se među glavnim sastojcima ispitivanih eteričnih ulja biljaka roda *Centaurea* ne nalaze dosad objavljeni poznati inhibitori kolinesteraza, njihova slaba inhibicija ispitivanim eteričnim uljima bila je očekivana.[155] Iako se u većini istraživanja smjesa spojeva, kao što su eterična ulja, potencijalno dobra inhibicijska aktivnost kolinesteraza povezuje s dominantnim komponentama, moguće je da je za inhibicijsku aktivnost kolinesteraza zaslužan spoj koji u sastavu ulja dolazi tek s manjim udjelom.

4.3.3. Antimikrobni učinak hlapljivih spojeva biljaka roda Centaurea

Eterična ulja odabranih biljaka roda *Centaurea* testirana su na antimikrobni učinak metodama disk-difuzije i metodom dilucije, kako je opisano u poglavlju 3.8.3. Nakon inkubacije od 24 sata na temperaturi od 37 ^{o}C očitani su rezultati nastali metodom disk-difuzije u obliku zona inhibicije rasta, izraženi u milimetrima. Rezultati metode dilucije, očitani nakon 24 sata inkubacije na temperaturi od 37 ^{o}C, izraženi su kao minimalna inhibitorna koncentracija u μg/mL. Sva eterična ulja otopljena su u 96%-tnom etanolu i pripremljena u koncentraciji 20 g/L.

Za ispitivanje antimikrobnog učinka odabrana su eterična ulja dobivena iz cvjetova i listova biljke *C. ragusina*, Marjan, Split, eterično ulje *C. solstitialis* s Marjana, Split, i eterično ulje *C. rupestris* s lokaliteta Kozjak, Malačka (6).

Testiranje je provedeno na sojevima Gram-pozitivnih bakterija: *Bacillus cereus* (soj ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (soj ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (soj ATCC 25923), *Clostridium perfringens* (soj FNSST 4999); Gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* (soj FNSST 982), *Klebsiella pneumoniae* (soj FNSST 011), *Chronobacter sakazakii* (soj FNSST 062), *Pseudomonas aeruginosa* (soj FNSST 014); gljivica: *Penicillium funiculosum* (soj FNSST 3724), *Saccharomyces cerevisiae* (soj FNSST 901), *Candida albicans* (soj ATCC 10231) i *Aspergillus fumigatus* (soj FNSST 3833).

Istraživanje antimikrobnog učinka hlapljivih spojeva iz eteričnih ulja istraženih u ovom doktorskom radu predstavlja prvo ovakvo istraživanje eteričnog ulja vrsta *C. ragusina, C. solstitialis* i *C. rupestris* sabranih na području Republike Hrvatske. Istraživanje eteričnog ulja endemične vrste *C. ragusina* i *C. rupestris* prvo je i jedino istraživanje ove vrste.

Rezultati testiranja antimikrobnog učinka hlapljivih spojeva eteričnih ulja vrsta roda *Centaurea* prikazani su **tablicama 4.8-4.10**..

Tablica 4.8. Antimikrobni učinak hlapljivih spojeva eteričnog ulja izoliranog iz cvjetova i listova ***Centaurea ragusina***, Marjan, Split, testirana metodama disk-difuzije i agar-dilucije

Mikroorganizmi	**Eterično ulje**				Antibiotici			
	Cvjetovi		Listovi		Amp		Gen	
	500*		500*					
	ZI	MIK	ZI	MIK	ZI	MIK	ZI	MIK
Gram-pozitivne bakterije								
Bacillus cereus	28,8	16,0	19,8	128	26,0	0,5	18,2	4,0
Clostridium perfringens	21,4	64,0	21,4	64	25,0	0,2	21,5	0,5
Enterococcus faecalis	27,4	32,0	23,6	64	23,0	0,6	11,0	4,0
Staphylococcus aureus	27,5	32,0	21,4	64	26,0	0,2	18,3	1,2
Gram-negativne baterije								
Chronobacter sakazakii	27,1	32,0	18,5	128	24,0	64,0	24,0	8,0
Escherichia coli	18,7	128,0	20,4	64	6,8	32,0	22,0	16,0
Klebsiella pneumoniae	25,3	64,0	21,5	64	6,2	64,0	18,0	8,0
Pseudomonas aeruginosa	16,2	128,0	19,1	128	6,2	32,0	17,0	32,0
Gljivice					Amf B			
Candida albicans	26,2	32,0	22,8	64	21,6	1,0		
Penicillium funiculosum	19,8	128,0	19,2	128	17,3	4,0		
Saccharomyces cerevisiae	27,2	32,0	21,3	64	19,2	2,0		

*testirane količine (µg/disk); ZI = promjer inhibicijske zone (mm); MIK = minimalna inhibitorna koncentracija, µg/mL; Amp = ampicilin; Gen = gentamicin; Amf B = amfotericin B.

Eterično ulje izolirano iz cvjetova i listova ***Centaurea ragusina,*** Marjan, Split, pokazalo je općenito dobre, ali različite razine anitmikrobnog potencijala na testirane mikroorganizme, s promjerima inhibicije u rasponu od 16,2 mm do 28,8 mm. Eterično ulje izolirano iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, pokazalo je snažniji antimikrobni učinak, s promjerima inhibicije u rasponu od 16,2 mm do 28,8 mm u usporedbi s eteričnim uljem izoliranim iz listova, koje je imalo promjere inhibicijskih zona u rasponu od 18,5 mm do 23,6 mm. Općenito bismo mogli reći da su, testirana metodom disk-difuzije, oba izolirana ulja pokazala promjere inhibicije veće ili vrlo bliske promjerima inhibicije antibiotika korištenih za usporedbu, iz čega bi se mogao izvući zaključak da oba eterična ulja pokazuju značajan antimikrobni učinak na većinu testiranih patogena. Posebno treba izdvojiti da su rezultati disk-difuzije pokazali upravo najveći antimikrobni učinak eteričnog ulja izoliranog iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, na Gram-negativne bakterije, i to na sojeve oportunističkih patogenih bakterija *E.coli, K. pneumoniae* i *P. aerugionsa*, na koje antibiotik ampicilin nije pokazao djelotvornost. Po istom kriteriju kod Gram-pozitivnih bakterija učinak eteričnog ulja izoliranog iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, bio je najveći u usporedbi s gentamicinom.

Uspoređujući promjere zona inhibicije eteričnih ulja i korištenih antibiotika, najveću zonu inhibicije pokazalo je eterično ulje izolirano iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, na Gram-pozitivnu bakteriju *Bacillus cereus* (ZI = 28,8 mm), što je bio bolji antimikrobni učinak u odnosu na oba korištena antibiotika, ampicilin (ZI = 26,0 mm) i gentamicin (ZI = 18,2 mm).

Eterično ulje izolirano iz listova ***Centaurea ragusina***, Marjan, Split, pokazalo je najveću zonu inhibicije na Gram-pozitivnu bakteriju *Enterococcus faecalis* (ZI = 23,5 mm), što je bio bolji antimikrobni učinak u odnosu na oba korištena antibiotika, ampicilin (ZI = 23,0 mm) i gentamicin (ZI = 11,0 mm).

Najznačajniji antimikrobni učinak u odnosu na korištene antibiotike pokazalo je eterično ulje izolirano iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, u odnosu na Gram-negativnu baketriju *Klebsiella pneumoniae*, gdje je za eterično ulje ZI = 25,3 mm, a za antibiotike ampicilin i gentamicin ZI = 6,0 mm i ZI = 18,0 mm. Isto eterično ulje pokazalo je značajan učinak na Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (ZI = 18,7 mm) i *Pseudomonas aeruginosa* (ZI =1 6,2 mm) u odnosu na ampicilin (ZI = 6,0 mm). U odnosu na gentamicin (ZI = 22,0 mm) eterično ulje iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, nije se pokazalo učinkovitije na Gram-negativnu bakteriju *Escherichia coli* (ZI = 18,7 mm), dok je antimikrobna aktivnost istoga eteričnog ulja na *Pseudomonoas aeruginosa* (ZI = 16,2 mm) bila vrlo bliska aktivnosti gentamicina (ZI = 17,0 mm).

Eterično ulje izolirano iz listova *C. ragusina*, Marjan, Split, pokazalo je lošiji antimikrobni učinak na Gram-pozitivne bakterije u usporedbi s ampicilinom, dok je u usporedbi s gentamicinom pokazalo znatno bolji antimikrobni učinak na sve testirane Gram-pozitivne bakterije, pri čemu se najviše ističe patogen *Enterococcus faecalis*, kod kojeg je ZI = 23,6 mm bio bitno veći od gentamicina, ZI = 11,0 mm.

Kod gljivica su oba eterična ulja izolirana iz cvjetova i listova *C. ragusina*, Marjan, Split, pokazala veće zone inhibicije na sva tri testirana patogena u odnosu na korišteni antimikotik, pri čemu je eterično ulje izolirano iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, pokazalo bolji antimikrobni učinak u odnosu na ono izolirano iz listova.

Minimalna inhibitorna koncentracija za oba testirana eterična ulja varirala je s obzirom na vrstu mikroorganizma na koji je testirana, u rasponu od 16 µg/mL do 128 µg/mL. Eterično ulje izolirano iz cvijeta pokazuje nešto bolji antimikrobni potencijal, s MIK-vrijednostima u rasponu od 16 µg/mL do 128 µg/mL u odnosu na ono izolirano iz lista, koje ima MIK-vrijednosti u rasponu od 64 µg/mL do 128 µg/mL. Gram-pozitivne bakterije čije su se MIK-vrijednosti kretale u rasponu od 16 µg/mL do 128 µg/mL bile su osjetljivije na oba uzorka eteričnog ulja u odnosu na Gram-negativne bakterije čije su se MIK-vrijednosti kretale u rasponu od 32 µg/mL do 128 µg/mL.

Najbolji antimikrobni učinak pokazalo je eterično ulje izolirano iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, na Gram-pozitivnu bakteriju *Bacillus cereus* (MIK = 16 µg/mL) i Gram-negativnu bakteriju *Chronobacter sakazakii*. Oba eterična ulja pokazala su značajnu inhibiciju rasta *Pseudomonas aeruginosa*, vodećega bolničkog patogena rezistentnog na brojne antibiotike, gdje je MIK-vrijednost za oba eterična ulja bila 128 µg/mL. Značajan antimikrobni učinak imala su oba eterična ulja u odnosu na gljivice, s MIK-vrijednostima u rasponu od MIK = 32 µg/mL do MIK = 128 µg/mL. Dobivene vrijednosti minimalne inhibitorne koncnetracije ukazuju na općenito dobar antimikrobni potencijal testiranih eteričnih ulja.

Tablica 13. Antimikrobni učinak hlapljivih spojeva eteričnog ulja izoliranog iz ***Centaurea solstitialis***, Marjan, Split, testirana metodama disk-difuzije i agar-dilucije

Mikroorganizmi	**Eterično ulje**		Antibiotici			
	500*		Cef		Gent	
	ZI	MIK	ZI	MIK	ZI	MIK
Gram-pozitivne bakterije						
Bacillus cereus	19,6	62,5	26,8	0,5	18,2	4,0
Clostridium perfringens	18,6	62,5	27,5	0,2	21,3	0,5
Enterococcus faecalis	20,8	125,0	23,5	0,1	14,6	4,0
Staphylococcus aureus	15,5	125,0	21,7	0,2	23,2	1,2
Gram-negativne baterije						
Chronobacter sakazakii	17,1	62,5	18,1	62,5	24,0	8,0
Escherichia coli	22,9	62,5	21,8	31,3	11,5	16,0
Klebsiella pneumoniae	18,4	125,0	21,0	62,5	18,2	8,0
Pseudomonas aeruginosa	18,4	62,5	10,4	31,3	9,2	32,0
Gljivice			Amf B			
Candida albicans	23,2	1,9	21,6	1,0		
Penicillium funiculosum	23,4	7,8	18,3	4,0		
Apergillus fumigatus	25,3	1,9	19,2	2,0		

*testirane količine (µg/disk); ZI = promjer inhibicijske zone (mm); MIK = minimalna inhibitorna koncentracija, µg/mL; Cef = cefotaksim; Gen = gentamicin; Amf B = amfotericin B.

Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja vrste ***Centaurea solstitalis*** do danas je testirana *in vivo* metodama disk-difuzije i mikrodilucije na širok raspon patogena. U ovom doktorskom radu prvi put je testirana aktivnost eteričnog ulja izolirana iz *C. solstitialis* iz Republike Hrvatske. Također je prvi put testiran antimikrobni učinak eteričnog ulja te vrste na patogene *Clostridium perfringens*; *Klebsiella pneumoniae*, *Chronobacter sakazakii*, *Penicillium funiculosum* and *Aspergillus fumigatus*. Rezultati testiranja prikazani su u **tablici 4.5**.

Eterično ulje izolirano iz *Centaurea solstitialis*, Marjan, Split, u koncentraciji od 500 µg/disk, testirano metodom disk-difuzije, pokazalo je antimikrobnu aktivnost na većinu testiranih patogena, s promjerima zona inhibicije u rasponu od ZI = 15,5 mm do ZI = 25,3 mm. To je eterično ulje pokazalo promjere inhibicije veće ili vrlo bliske promjerima inhibicije antibiotika korištenih za usporedbu, iz čega bi se mogao izvući zaključak da eterično ulje pokazuje značajan antimikrobni učinak na većinu testiranih patogena. Gram-negativne bakterije bile su općenito osjetljivije na istraživano eterično ulje u odnosu na Gram-pozitivne bakterije.

Među Gram-negativnim baterijama eterično ulje *C. solstitialis*, testirano metodom disk-difuzije, pokazalo je najbolju inhibitornu aktivnost na patogen *Pseudomonas aeruginosa* sa ZI = 18,4 mm, što je bilo dvostruko više nego promjer inhibicijske zone kod korištenog antibiotika cefotaksima, ZI = 10,4 mm i gentamicina, ZI = 9,2 mm. Značajnu antimikrobnu aktivnost to je ulje pokazalo na Gram-negativnu bakteriju *Escherichia coli*, sa ZI = 22,9 mm, što je vrlo blisko ili dvostruko veće u usporedbi s antibioticima cefotaksimom, ZI = 21,8 mm i gentamicinom, ZI = 11,5 mm.

Sve testirane gljivice bile su osjetljivije na djelovanje eteričnog ulja izoliranog iz *Centaurea solstitialis*, Marjan, Split, u usporedbi sa standardnim fungicidom amfotericinom. Promjer inhibicijske zone za *Penicillium funiculosum* bio je ZI = 23,4 mm, a za amfotericin ZI = 21,6 mm; za *Aspergillus fumigatus* ZI = 25,3 mm, a amfotericin ZI = 18,3 mm te za *Candida albicans* ZI = 23,2 mm, a amfotericin ZI = 19,2 mm.

Minimalne inhibitorne koncentracije eteričnog ulja izoliranog iz *Centaurea solstitialis*, Marjan, Split, na testirane patogene metodom agar-dilucije kretale su se u rasponu od MIK = 1,9 µg/mL do MIK = 125,0 µg/mL. Bitno je istaknuti da su Gram-negativne bakterije pokazale nešto nižu minimalnu inhibitornu koncentraciju i bile osjetljivije na istraživano eterično ulje od Gram-pozitivnih bakterija testiranih u ovom istraživanju. Najbolju inhibitornu aktivnost pokazalo je eterično ulje na *Chronobacter sakazakii*, MIK = 62,5 µg/mL u usporedbi sa standardnim antibiotikom cefotaksimom, MIK = 62,5 µg/mL.

Eterično ulje izolirano iz *C. solstitialis*, Marjan, Split, pokazalo je značajnu antifungalnu aktivnost, s MIK-vrijednostima u rasponu od MIK = 1,9µg/mL do MIK = 7,8 µg/mL. Najbolju antifungalnu aktivnost to je eterično ulje pokazalo na gljivicu *Aspergillus fumigatus*, MIK = 1,9 µg/mL, nešto manje u odnosu na fungicid amfotericin B, MIK = 2,0 µg/mL. Za patogen *Candida albicans* vrijednost MIK = 1,9 µg/mL bila je blizu vrijednosti za standardni fungicid amfotericin B, MIK = 1,0 µg/mL, što ukazuje na dobru antifungalnu aktivnost i na taj patogen. Umjerenu antifungalnu aktivnost to je ulje imalo na *Penicillium funiculosum*, MIK = 7,8 µg/mL, u usporedbi s amfotericinom B, MIK = 4,0µg/mL.

Tablica 14. Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja *Centaurea rupestris* s lokaliteta Malačka (6), testirana metodama disk-difuzije i agar-dilucije

Mikroorganizmi	**Eterično ulje**		Antibiotici			
	500*		Cef		Gen	
	ZI	MIK	ZI	MIK	ZI	MIK
Gram-pozitivne bakterije						
Bacillus cereus	7,0	500	26,8	0,48	18,2	4,0
Clostridium perfringens	7,0	500	27,5	0,24	21,3	0,5
Enterococcus faecalis	9,0	200	23,5	0,12	14,6	4,0
Staphylococcus aureus	7,0	500	21,7	0,24	23,2	1,2
Gram-negativne baterije						
Chronobacter sakazakii	7,0	500	18,1	62,50	24,0	8,0
Escherichia coli	7,0	500	21,8	31,25	11,5	16,0
Klebsiella pneumoniae	7,0	500	21,0	62,50	18,2	8,0
Pseudomonas aeruginosa	7,0	500	10,4	31,25	9,2	32,0
Gljivice			Amf B			
Candida albicans	8,0	500	21,6	1,0		
Saccharomyces cerevisiae	7,0	500	19,2	2,0		
Penicillium funiculosum	8,0	500	18,3	4,0		
Apergillus fumigatus	8,0	500	19,2	2,0		

*testirane količine (µg/disk); ZI = promjer inhibicijske zone (mm); MIK = minimalna inhibitorna koncentracija, µg/mL; Cef = cefotaksim; Gen = gentamicin; Amf B = amfotericin B.

Provedeno istraživanje antimikrobnog učinka eteričnog ulja izoliranog iz vrste *Centaurea rupestris*, Kozjak, Malačka (6), testirano na sve navedene mikroorganizme predstavlja prvo ovakvo istraživanje te vrste u Republici Hrvatskoj i svijetu, a rezultati su prikazani u **tablici 4.6**.

Eterično ulje izolirano iz vrste *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6), pokazalo je promjere zona inhibicije u rasponu od ZI = 7,0 mm do ZI = 9,0 mm, iz čega zaključujemo da nije postojala značajna razlika u inhibiciji rasta tim eteričnim uljem kod Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. U usporedbi s korištenim antibioticima cefotaksimom i gentamicionm zone inhibicije koje je pokazalo eterično ulje bile su općenito znatno manje, odnosno antimikrobni učinak na tesitrane patogene bio je znatno slabiji.

Uspoređujući promjere zona inhibicije, najbolji je antimikrobni učinak to eterično ulje imalo na patogen *Pseudomonas aeruginosa*, ZI = 7,0 mm, što je vrlo blizu promjera zona inhibicije za korištene poznato dobre antibiotike cefotaksim, ZI = 10,4 mm i gentamicin, ZI = 9,2 mm.

Značajniju inhibiciju u odnosu na ostale patogene to je eterično ulje na *Enterococcus faecalis*, ZI = 9,0 mm, međutim ono je i dalje slabijeg učinka u odnosu na antibiotik gentamicin, ZI = 14,6 mm i cefotaksim, ZI = 23,5 mm.

Utvrđeno je da je za sve testirane patogene, uključujući Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te gljivice, minimalna inhibitorna koncentracija eteričnog bila 500 µg/mL, osim u slučaju patogena *Enterococcus faecalis*, gdje je eterično ulje pokazalo najbolji antimikrobni potencijal, MIK = 200 µg/mL.

Za usporedbu aktivnosti eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Centaurea* u ovom doktorskom radu uzeti su literaturni izvori prijašnjih istraživanja. Često se prilikom uspoređivanja antimikrobnih učinaka eteričnih ulja dobivenih iz različitih studija autori osvrću na općenite zaključke o antimikrobnom učinku na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije te gljivice. Važno je naglasiti da je rezultate među različitim studijama moguće usporediti ako su istraživanja rađena u istim uvjetima i s istim sojevima patogena. Moguće je usporediti rezultate studija s različitim vrstama roda *Centaurea* i sojevima korištenim u istraživanjima antimikrobnog djelovanja ukoliko se vodi računa o tome da se uspoređuju rezultati rađeni u istim uvjetima i na istim sojevima.

Antimikrobno djelovanje eteričnog ulja dosad je ispitano kod nekoliko vrsta roda *Centaurea*: *C. cineraria* subsp. *umbrosa* (Lacaita) Pign., *C. napifolia* L., *C. amanicola* Hub.-Mor., *C. consanguinea* DC., *C. ptosimopappa* Hayek, *C. nicaeensis* All., *C. parlatoris* Helder, *C. solstitialis* L. ssp. *schouwii* (DC.), *C. sessilis*, *C. armena*, *C. aladagensis*, *C. appendicigera*, *C. helenioides*, *C. pannonica*, *C. jacea C. pullata*, *C. grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii*, *C. affinis*, *C. pulcherrima* Willd. var. *pulcherrima*, *C. solstitialis* i *C. behen.* [13, 17, 18, 35, 101, 102, 114, 123, 137]

Prema dosadašnjim literaturnim podacima eterična ulja izolirana iz vrsta *C. ragusina* i *C. rupestris* nisu testirana na antimikrobni učinak, dok je *C. solstitialis* istražena u dvama literaturnim nalazima s različitim rezultatima.

Antimikrobni učinak eteričnog ulja *C. solstitialis* istraživan je u dvjema studijama, kod kojih se antimikrobna aktivnost eteričnih ulja navedene vrste razlikuje. U objema navedenim studijama korišteni su različiti patogeni, od kojih većina nije korištena u ovom doktorskom radu (Senatore, 2008; Lograda, 2013). U istraživanju Senatore i sur. (2008) korišteni su samo patogeni *Enterococcus faecalis* (soj ATCC 29212) i *Staphylococcus aureus* (soj ATCC 25923), kao i u ovom doktorskom radu. U istraživanju Lograda i sur. (2013) korišten je samo patogen *Staphylococcus aureus* (soj ATCC 25923), kao u ovom doktorskom radu.

U istraživanju antimikrobne aktivnosti eteričnog ulja *C. solstitialis* L. ssp. *schouwii* (DC.) nije uopće bilo antimikrobnog učinka na testirane patogene. U sastavu tog eteričnog ulja dominantna komponenta bila je heksadekanska kiselina (29,4%).[105]

U istraživanju Lograda i sur. (2013) antimikrobni učinak eteričnog ulja *C. solstitialis* bio je umjeren na sve testirane patogene. Najznačajniju antimikrobnu aktivnost to je eterično ulje pokazalo na patogene *Eschericihia coli* (soj ATCC 13047) i *Staphylococcus aureus* (soj ATCC 25923), gdje su dobivene zone inhibicije eteričnog ulja bile znatno veće od zona dobivenih djelovanjem antibiotika. Dominantne komponente toga eteričnog ulja bile su: heksadekanska kiselina (12,8%), heneikosan (17,3%), trikosan (10,5%), pentakosan (5,6%) i kariofilen-oksid (5,0%).[123]

Zbog prisutnosti različitih komponenti u sastavu eteričnih ulja teško je zaključiti o potencijalnim komponentama koje su odgovorne za dobar antimikrobni učinak, a nalaze se u sastavu eteričnog ulja. Poznato je i da više biološki aktivnih komponenti može imati drugačija ciljna mjesta svoje aktivnosti, čime mogu imati sinergijski antimikrobni učinak. Kemijski spojevi slične strukture mogu pokazati sinergijski efekt, čime se djelovanje jednog spoja multiplicira u prisutnosti drugoga biološki važnog spoja. Prisutnost više različitih biološki aktivnih komponenti u sastavu eteričnog ulja može dovesti do pojave antagonizma ili sinergizma među pojedinim komponentama eteričnog ulja. [35, 189]

Unatoč tome što je teško sa sigurnošću tvrditi koji su spojevi iz smjese spojeva u eteričnom ulju odgovorni za antimikrobni učinak, ipak ćemo se osvrnuti na glavne komponente sastava eteričnog ulja proučavanih vrsta roda *Centaurea* koje su dosad istražene u literaturnim

izvorima i njihov antimikrobni učinak. Također ćemo pokušati povući korelaciju između dominantnih komponenti u sastavu eteričnih ulja ispitivanih u ovom doktorskom radu i antimikrobnog učinka. Iako je moguće da bilo koja komponenta u sastavu eteričnog ulja, bez obzira na njezin udio, može imati potencijalno dobar antimikrobni učinak, obično se u istraživanjima smjese spojeva kao što je eterično ulje razmatraju dominantne komponente.

Budući da su sva navedena testiranja antimikrobnog učinka u ovom doktorskom radu rađena u istim uvjetima, s istim koncentracijama eteričnog ulja, na istim sojevima i s istim otapalima, moguće je usporediti antimikrobni učinak eteričnih ulja odabranih vrsta roda *Centaurea* proučavanih u ovom doktorskom radu.

Iz prezentiranih rezultata općenito možemo reći da su sva ispitana eterična ulja imala antimikrobni učinak. Najznačajniji antimikrobni učinak na sve testirane patogene imalo je eterično ulje izolirano iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, nakon njega ono izolirano iz listova *C. ragusina*, Marjan, Split, zatim eterično ulje *C. solstitialis*. Marjan, Split, i naposijetku *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6).

U sastavu eteričnog ulja izoliranog iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, dominantni spojevi bili su seskviterpeni te oksidirani seskviterpeni. Među njima su najzastupljeniji γ-muurolen (17,9%) i germakren D (17,1%), dok su kiseline i ugljikovidici bili zastupljeniji u eteričnom ulju izoliranom iz listova *C. ragusina*, Marjan, Split.

U istraživanju u ovom doktorskom radu eterično ulje izolirano iz *C. solstitialis*, Marjan, Split, pokazalo je antimikroban učinak na sve testirane patogene, a na Gram-negativnu bakteriju *Echericihia coli* pokazalo je značajan antimikrobni učinak, kao što je bio slučaj i s uljem iste vrste u istraživanju Lograde i sur. (2013). U sastavu toga eteričnog ulja izoliranog iz *C. solstitialis* najzastupljenije komponente bile su: heksadekanska kiselina (26,1%), *α*-linolenska kiselina (17,9%), germakren D (15,3%) i heptakosan (8,1%).[123]

Senatore i sur. (2008) testirali su antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja *C. solstitialis* na većinu mikroba testiranih u istraživanju u ovom doktorskom radu, no eterično ulje u ispitivanoj koncentraciji nije pokazalo nikakvu antimikrobnu aktivnost. Sastav eteričnog ulja

Senatorea i sur. (2008) vrlo je sličan sastavu eteričnog ulja ovog istraživanja i kao dominantu komponentu sadrži heksadekansku kiselinu (29,4%), heptakosan (7,7%), (*Z, Z*) oktadeka-9,12-diensku kiselinu (4,9%) i pentakosan (5,2%). Razlika između toga eteričnog ulja *C. solstitialis* i eteričnog ulja *C. solstitialis* proučavanog u ovom doktorskom radu vidi se u udjelu germakrena D. U istraživanju u ovom doktorskom radu germakren D bio je jedan od 4 glavna sastojka eteričnog ulja *C. solstitialis*, s udjelom od 15,3%, dok je u eteričnom ulju Senatorea (2008) bio prisutan u udjelu od samo 0,6%. Uočavajući ovu razliku moglo bi se zaključiti da dobra antimikrobna aktivnost eteričnog ulja testiranog u istraživanju u ovom doktorskom radu može imati veze s velikim udjelom germakrena D.

Povezanost antimikrobnog učinka i kemijskog sastava eteričnih ulja uočena je u prijašnjim istraživanjima djelovanja eteričnog ulja *Centaurea* i ukazuje na to da dobar antimikrobni učinak ima veze sa sadržajem germakrena D. Tako prethodno istražena eterična ulja vrsta roda *Centaurea* koja imaju dobru antimikrobnu aktivnost imaju značajan udio germakrena D i on čini jednu od glavnih komponenti tih eteričnih ulja. [18,35] Isto tako eterična ulja vrsta roda *Centaurea* koja su pokazala nisku ili beznačajnu antimikrobnu aktivnost nisu sadržavala značajan udio germakrena D. [13, 17, 101, 105, 114, 123]

Germakren D trenutno nije komercijalno dostupan kao čisti spoj, te nije moguće napraviti njegovo testiranje antimikrobnog učinka, iako se u mnogim radovima navodi kao komponenta eteričnog ulja koja bi mogla biti zaslužna za dobru antimikrobnu aktivnost.[18]

Dobro je poznata i antimikrobna aktivnost masnih kiselina. Povezuje se s dugolančanim masnim kiselinama i najčešće uključuje oleinsku kiselinu, linoleinsku kiselinu i α-linolensku kiselinu, koja je u eteričnom ulju izoliranom iz *C. solstitialis*, Marjan, Split, prisutna u značajnom udjelu (17,9%). Najvažniji cilj djelovanja tih kiselina kod antifungalne aktivnosti je stanična membrana budući da masne kiseline povećavaju fluidnost membrane, čime uzrokuju staničnu smrt. [169, 190]

U eteričnom ulju izoliranom iz *C. solstitialis*, Marjan, Split, masne se kiseline nalaze u velikom udjelu, poput heksadekanske (26,1%) α-linolenske (17,9%). No u sastavu eteričnih ulja izoliranih iz cvjetova i listova *C. ragusina*, Marjan, Split, koji su pokazivali dobar

antimikrobni učinak, kiseline općenito nisu bile značajno zastupljene. U eteričnom ulju izoliranom iz *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6), sa slabim antimikrobnim učinkom, kiseline su zastupljene velikim udjelom.

Također je poznata dobra antimikrobna aktivnost fitola na širok raspon patogenih mikroorganizam, kao i ketona acetofenona.[191-193]

Budući da svako od proučavanih ulja ima različit sastav i sadržaj dominantnih komponenti, nije moguće precizno definirati koji spoj je zaslužan za dobar antimikrobni učinak. Moguće je da je za dobar antimikrobni učinak zaslužan i sinergistički učinak komponenti eteričnog ulja. Iako smo se osvrnuli na dominante komponente u sastavu istraživanih eteričnih ulja i njihov antimikrobni učinak, za antimikrobni učinak može biti zaslužna biološki aktivna komponenta koja se nalazi u malom udjelu u sastavu eteričnog ulja. Svakako bi u svrhu preciznijeg određivanja antimikrobnog učinka spojeva iz eteričnog ulja trebalo testirati čiste komponente iz eteričnog ulja, što predstavlja sljedeći korak u istraživanjima koja će proizaći iz ovoga doktroskog rada.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Za istraživanja u ovom radu odabrane su: stenoendem *Centaurea ragusina*, endem šireg rasprostranjenja *Centaurea rupestris* i kozmopolit *Centaurea solstitialis* s različitih lokaliteta.

- Citogenetski profil određen je veličinom genoma te brojem i izgledom kromosoma uz pomoć metode protočne citometrije i standardnih kariloških metoda.

- Broj kromosoma za *C. ragusina* i *C. rupestris* iznosi 2n = 20, dok za *C. solstitialis* iznosi 2n = 16 i u skladu je s rezultatima prijašnjih istraživanja.

- Veličine genoma su sljedeće: za *C. ragusina* 3,34 (± 0,02) do 3,61 (± 0,08)pg, za C. rupestris 3,43 (± 0,04) do 3,64 (± 0,05)pg i za C. solstitialis 1,95 ± 0,07 pg.

- Kariotip *C. rupestris* i *C. solstitialis* iz Republike Hrvatske opisani su prvi put. Za *C. rupestris* sastoji se od sedam parova metacentričnih (1, 2, 3, 6, 7, 9 i 10) i tri para submetacentričnih kromosoma (4, 5 i 8), od kojih četvrti par ima satelite, a za *C. solstitialis* od četiri para metacentričnih (1, 2, 3 i 5), dva para submetacentričnih (6 i 8) i dva para akrocentričnih kromosoma (4 i 7), od kojih sedmi i osmi par imaju satelite.

- ♦ -

- Fitokemijski su proučavane vrste čija je autentičnost potvrđena citogenetskim analizama.

- Eterično ulje iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, kao najzastupljenije sadrži terpenske spojeve s germakrenom D kao najzastupljenijom komponentom, dok eterično ulje iz listova sadrži terpenske i neterpenske komponente sa sličnim udjelom.

Najzastupljenije komponente tog ulja su ciklookta-1,3-dien, oktadek-9-enska kiselina i acetofenon. Eterično ulje *C. ragusina*, Vis, najvećim dijelom sadrži neterpenske spojeve. Najzastupljenije komponente tog ulja su heksadekanska kiselina, heptakosan i acetofenon.

- Eterično ulje *C. solstitialis* Marjan, Split, sadrži uglavnom neterpenskespojeve. Najzastupljenije u tom ulju su heksadekanska kiselina, α-linolenska kiselina i germakren D.

- Eterično ulje *C. rupestris* s lokaliteta Malačka (6) sadrži nešto zastupljenije terpenske od neterpenskih spojeva. Najzastupljenije komponente tog ulja su germakren D i heptakosan. Eterično ulje *C. rupestris* s lokaliteta Malačka (8) sadrži zastupljenije terpenske spojeve od neterpenskih. Najzastupljenija komponenta tog ulja je germakren D. Eterično ulje *C. rupestris* s otoka Krka kao zastupljenije sadrži neterpenske u donosu naterpenske spojeve. Najzastupljenije komponente tog ulja su heksadekanska kiselina, heptakosan i α-linolenska kiselina.

- Kao dominantne komponente svih proučavanih eteričnih ulja uočavaju se neoksidirani i oksidirani seskviterpenski spojevi te između neterpenskih spojeva karboksilne kiseline i ugljikovodici.

- Seskviterpeni germakren D, β-kariofilen te heksadekanska kiselina identificirani u svim proučavanim eteričnim uljima vrsta roda *Centaurea* bilo kao dominantni spojevi bilo s manjim udjelima.

- ♦ -

- Biološki učinak hlapljivih spojeva odabranih vrsta odnosio se na antioksidacijski potencijal, inhibicijska svojstva na enzime acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BuChE) te antimikrobni učinak.

- Izolirana hlapljiva ulja pokazuju slab antioksidacijski potencijal u usporedbi s poznato dobrim antioksidansima, kakvi su BHA i vitamin C.

- Izolirana hlapljiva ulja pokazuju slabu sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE u usporedbi s poznato dobrim inhibitorima, kakvi su takrin i eserin, no djelovanje je nešto bolje na AChE nego na BChE.

- Sva ispitana eterična ulja pokazala su značajan antimikrobni učinak. Najznačajniji učinak na sve testirane patogene imalo je eterično ulje izolirano iz cvjetova *C. ragusina*, Marjan, Split, nakon njega ono izolirano iz listova *C. ragusina*, Marjan, Split, zatim eterično ulje *C. solstitialis*. Marjan, Split, i naposljetku *C. rupestris*, Kozjak, Malačka (6).

§ 6. Popis oznaka, kratica i simbola

A	apsorbancija
AChE	enzim acetilkolinesteraza
ACh	acetilkolin
acetil CoA	acetil-koenzim A
AD	Alzheimerova bolest
Asn	asparaginska kiselina
A-T	bazni par adenin-timin
ATCh	acetiltiokolin
ATChI	acetiltiokolin-jodid
BHA	butil-hidroksianizol
BHT	butil-hidroksitoluen
BCh	butirilkolin
BChE	butirilkolinesteraza
BTChI	butiriltiokolin-jodid
CMC	cirkummediteranska i eurosibirska regija
C_5	hemiterpeni
C_{10}	monoterpeni
C_{15}	seskviterpeni
C_{20}	diterpeni
C_{25}	sesterpeni
C_{30}	triterpeni
DAPI	4,6 diamino-2-fenilindol
DMAPP	3,3 dimetil-alil-pirofosfat
DNA	*engl*. deoxyribonucleic acid
DPPH	*engl.* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva) kiselina
E	enzim
E.C. 3.1.1.7	numerička klasifikacija za acetilkolinesterazu
E.C. 3.1.1.8	numerička klasifikacija za butirilkolinesterazu

EMC	istočnomediteranska regija
FPP	2E, 6E farnezil-pirofosfat
FRAP	*engl.* Ferric Reducing Antioxidant Potential
GSAD	baza podataka o veličini genoma vrsta u porodici *Asteraceae*
GC	plinska kromatografija
G-C	bazni par gvanin i citozin
GC-MS	plinska kromatografija-masena spektrometrija
Glu	glutaminska kiselina
GFPP	2E, 6E, 10E, 14E geranilfarnezil-pirofosfat
GGPP	2E, 6E, 10E geranilgeranil-pirofosfat
GPP	geranil-pirofosfat
His	histidin
HMG-CoA	*β*-hidroksi-*β*-metil-glutaril koenzim A
IPP	isopentenil-pirofosfat
IR	*engl.* infrared - infracrveni spektar
IUPAC	*engl.* International Union of Pure and Applied Chemistry
k_{cat}	okretni broj enzima
Leu	leucin
[M+]	molekulski ion
MBC	minimalna baktericidna koncentracija
Mbp	mega parovi baza
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MS	masena spektrometrija
MVA	mevalonska kiselina
m/z	omjer masa kroz naboj
NN	Narodne novine
NMR	nuklearna magnetska rezonanca
PI	propidijum-jodid
rDNA	ribosomska DNA
RNA	*engl.* ribonucleic acid; ribonukleinska kiselina
RNS	*engl.* Reactive nitrogen species; reaktivni kisikovi spojevi
RKS	reaktivni kisikovi spojevi

S	aktivnost enzima u prisutnosti uzorka koji se ispituje
SAD	Sjedinjene Američke Države
Ser	serin
SOD	superoksid-dismutaza
T	transmitacija
TNB	2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazin
Thr	treonin
U	Unit - 1 U acetilkolinesteraze hidrolizira 1 μmol acetilkolina, na kolin i acetat, po minuti pri pH = 8 i temperaturi od 37 °C
UV	ultra-ljubičasto
UV/VIS	ultra-ljubičasto/vidljivo
ZI = promjer zone inhibicije	
WMC	zapadnomediteranska regija
2C	veličina genoma, količinu DNA u nerepliciranoj jezgri
1C	polovica vrijednosti veličine genoma; količina DNA koja se nalazi u haploidnoj jezgri nerepliciranog seta kromosom, izražava se u pikogramima (pg)
1Cx	monoploidna veličina genoma, izražava se u mega parovima baza (Mbp)
1pg	pikogram, mjerna jedinica, iznosi 978 Mbp
2x	diploid
4x	tetraploid

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. Siljak-Yakovlev, M. E. Solic, O. Catrice, S. C. Brown, D. Papes, Nuclear DNA content and chromosome number in some diploid and tetraploid *Centaurea* (*Asteraceae*: Cardueae) from the Dalmatia region. *Plant Biol* **7** (2005) 397–404.
2. S. Bancheva, J. Greilhuber, Genome size in Bulgarian *Centaurea* S.L. (*Asteraceae*) *Plant Systematics and Evolution* **257** (2006) 95–117.
3. S. Kovačić, T. Nikolić, M. Ruščić, M. Milović, V. Stamenković, N. Jasprica, J. Topić, D. Mihelj, S. Bogdanović, Flora jadranske obale i otoka – 250 najčešćih vrsta. *Školska knjiga, Zagreb* (2008).
4. I. Boršić, Phylogeography of Centaurea (Compositae) in the circum-Adriatic region, Doktorska dizetracija, biološki odsjek, *Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu* (2013).
5. T. Nikolić, Sistemska botanika – raznolikost i evolucija biljnog svijeta. *Alfa d.d. Zagreb*, (2013)
6. D. Marie, S. C. Brown, A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell* **78** (1993) 41–51.
7. E. Pichersky, D. R. Gang, Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* **5** (2000) 439–445.
8. G. Flamini, M. Tebano, P. L. Cioni, Y. Bagci, H. Dural, K. Ertugrul, T. Uysal, A. Savran, A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey *Plant Systematics and Evolution* **261** (2006) 217–228.
9. N. J. Sadgrove, G. L. Jones, Cytogeography of essential oil chemotypes of Eremophila longifolia F. Muell (Scrophulariaceae). *Phytochemistry* **26** (2014) 00196-00194.
10. G. Flamini, K. Ertugrul, P. L. Cioni, I. Morelli, H. Dural, Y. Bagci, Volatile constituents of two endemic *Centaurea* species from Turkey: *C.pseudoscabiosa* subsp *pseudoscabiosa* and *C.hadimensis*. Biochemical Systematics and Ecology **30** (2002) 953–959.
11. H. B. Dural, Y., Ertugrul, K.; Demirelma, H.; Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I., Essential oil composition of two endemic *Centaurea* species from Turkey, *Centaurea*

mucronifera and *Centaurea chrysantha*, collected in the same habitat. Biochemical Systematics and Ecology **31** (2003) 1417–1425.

12. M. Asadipour, M. Moslem Lari Najaf, Volatile oil composition of *Centaurea aucheri* (Dc.) Wagenitz ', *DARU*, **13** (2005).
13. N. Yayli, A. Yaşar, C. Güleç, A. Usta, S. Kolaylı, K. Coşkunçelebi, Ş. Karaoğlu, Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry* **66** (2005) 1741-1745.
14. A. R. Esmaeili, Abdolhossein; Akbari, Mohammad T.; Moazami, Nasrin; Masoudi, Shiva; Amiri, Hamzeh, Composition of the Essential Oils of *Xanthium strumarium* L. and *Cetaurea solstitialis* L. from Iran. Journal of Essential Oil Research **18** (2006) 427.
15. C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, M. Bruno, S. Rosselli, F.M. Raimondo, V. Spadaro, Chemical composition of the essential oils of *Centaurea sicana* and *C.giardinae* growing wild in Sicily. Natural Product Communications **3** (2008) 919-922.
16. S. Rosselli, M. Bruno, A. Maggio, R. A. Raccuglia, S. Bancheva, F. Senatore, C. Formisano, Essential oils from the aerial parts of *Centaurea cuneifolia* Sibth. & Sm. and *C. euxina* Velen., two species growing wild in Bulgaria. *Biochemical Systematics and Ecology* **37** (2009) 426–431.
17. S. Djeddi, M. Sokovic, H. Skaltsa, Analysis of the Essential Oils of Some *Centaurea* Species (*Asteraceae*) Growing Wild in Algeria and Greece and Investigation of Their Antimicrobial Activities *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **14** (2011) 658–666.
18. N. Kahriman, G. Tosun, N. Y. Iskender, S. A. Karaoglu, N. Yayli, Antimicrobial activity and a comparative essential oil analysis of *Centaurea pulcherrima* Willd. var. *pulcherrima* extracted by hydrodistillation and microwave distillation. *Natural Product Research* **26** (2012) 703–712.
19. O. Kılıc, Essential oil compounds of three *Centaurea* L. taxa from Turkey and their chemotaxonomy. *Journal of Medicinal Plants Research* **7** (2013) 1344–1350.
20. S. B. D. Erel, B.; Demir, S.; Karaalp, C.; Baser, K., H., C., Composition of the essential oils of *Centaurea aphrodisea, C. polyclada, C. athoa, C. hyalolepis* and *C. iberica*. Journal of Essential Oil Research **25** (2013) 79–84.
21. B. Azadi, E. Nouri, The essential oil composition of *Centaurea intricata* Boiss. flowering aerial parts *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* **04** (2014) 25–27.

22. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils-a Review *Food Chem Toxicol.* **46** (2008) 446–75.
23. M. J. Abad, L. M. Bedoya, P. Bermejo Chapter 14 - Essential oils from the *Asteraceae* family active against multidrug-resistant bacteria A2 - Kon, Mahendra Kumar Raikateryna Volodymyrivna', *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components* (San Diego: Academic Press, 2013) 205–221.
24. R. P. Singh, S. Sharad, S. Kapur, Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants, Journal of Indian Academy of Clinical Medicine **5** (2004) 218–225.
25. G. C. Yen, P. Duh, Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species, *Food Chemistry* **42** (1994) 629–632.
26. I. F. Benzie, J. J. Strain, The Ferric Reducing Ability of Plasma (Frap) as a measure of "Antioxidant Power": The Frap Assay *Anal Biochem* **239** (1996) 70–76.
27. E. Prenesti, S. Toso, S. Berto, Redox chemistry of red wine, quantification by an oscillating reaction of the overall antioxidant power as a function of the temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005) 4220–4227.
28. M. Jukic, O. Politeo, M. Maksimovic, M. Milos, In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother Res* **21** (2007) 259–261.
29. O. Politeo, M. Jukić, M. Miloš, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of Twelve Spice Plants, *Croatica Chemica Acta* **79** (2006) 545–552.
30. T. Kulišić-Bilušić, V. Katalinić, V. Dragović-Uzelac, I. Ljubenkov, A. Kriško, B. Dejanović, M. Jukić, O. Politeo, G. Pifat, M. Miloš, Antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous tea infusions in vitro, *Food technology and biotechnology* **46** (2008) 368–375.
31. M. Jukić, F. Burčul, I. Carev, O. Politeo, M. Miloš, Screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of selected plants from Croatia, *Natural product research* **26** (2012) 1703–1707.
32. G. L. C. Ellman, K. D.; Andres jr, V.; Featherstone, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology **7** (1961) 88–95.

33. J. Mastelić, O. Politeo, I. Jerković, N. Radošević, Composition and antimicrobial activity of helichrysum italicum essential oil and its terpene and terpenoid fractions, *Chemistry of natural compounds* **41** (2005) 35–40.
34. O. Politeo, M. Skočibušić, A. Maravić, M Ruščić, M. Miloš, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Endemic Dalmatian Black Pine (Pinus nigra ssp. dalmatica) *Chemistry & biodiversity* **8** (2011) 540**–**547.
35. O. Politeo, M. Skocibusic, I. Carev, F. Burcul, I. Jerkovic, M. Sarolic, M. Milos, Phytochemical profiles of volatile constituents from *Centaurea ragusina* leaves and flowers and their antimicrobial effects. *Nat Prod Commun.* **7** (2012) 1087–1090.
36. O. Politeo, M. Skočibušić, F. Burčul, A. Maravić, I. Carev, M. Ruščić, M. Miloš, Campanula portenschlagiana Roem. Et. Schult.: Chemical and antimicrobial activities Chemistry & biodiversity **10** (2013) 1072**–**1080.
37. R. Domac, Flora Hrvatske *Školska knjiga, Zagreb* (1994)
38. A. Susanna, Garcia-Jacas, N., Tribe Cardueae. The families and genera of vascular plants. Flowering Plants. Eudicots. Asterales. 8 (2007) 123–146.
39. A. Susanna, N. Garcia Jacas, Cardueae (Carduoideae). In: Funk VA, Susanna A, Stuessy T. F., Bayer R. J. (eds). *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy* (2009) 293–313.
40. C. S. Roché, A. Susanna, New habitats, new menaces: *Centaurea x kleinii* (*C. moncktonii* x *C. solstitialis*), a new hybrid species between two alien weeds. *Collectanea Botanica* **23** (2010) 17–23.
41. C. T. Roché, D. C. Thill, Biology of common crupina and yellow starthistle, two Mediterranean winter annual invaders in western North America. *Weed Science* **49** (2001) 439–447.
42. N. Garcia-Jacas, T. Uysal, K. Romashchenko, V. N. SuÁRez-Santiago, K. ErtuĞRul, A. Susanna, Centaurea Revisited: A Molecular Survey of the Jacea Group. *Annals of Botany* **98** (2006) 741–753.
43. N. Garcia-Jacas, A. Susanna, T. Garnatje, R. Vilatersana, Generic delimitation and phylogeny of the subtribe Centaureinae (*Asteraceae*): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis *Annals of Botany* **87** (2001) 503–515.
44. A. Hilpold, N. Garcia-Jacas, R. Vilatersana, A. Susanna, Taxonomical and nomenclatural notes on *Centaurea*: A proposal of classification, a description of new sections and

subsections, and a species list of the redefined section *Centaurea*. *Collectanea Botanica* **33** (2014).

45. I. Boršic, A. Susanna, S. Bancheva, N. Garcia-Jacas, Centaurea sect. Cyanus: nuclear phylogeny, biogeography, and life-form evolution. *Int. J. Plant Sci.* **172** (2011) 238–249.
46. M. Font, N. Garcia-Jacas, R. Vilatersana, C. Roquet, A. Susanna, Evolution and biogeography of Centaurea section Acrocentron inferred from nuclear and plastid DNA sequence analyses. *Ann. Bot.* **103** (2009) 985–997.
47. G. Vonica, M. Cantor, The Polymorphism and Hybridization of the *Centaurea* species, *Bulletin UASVM Horticulture*, **68** (2011).
48. F. Conti, C. Giordano, B. Moraldo, C. Ricceri, Contributions to the taxonomy of the Italian and northern Balkanic taxa in the Centaurea rupestris group (*Asteraceae*), *Ann. Bot. Fennici* **48** (2011) 193–218.
49. J. Loureiro, P. Trávníček, J. Rauchová, T. Urfus, P. Vít, M. Štech, S. Castro, J. Suda, The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* **82** (2010) 3–21.
50. S. Siljak-Yakovlev S. Etude cytogénétique et palynologique de Compositae endémiques ou reliques de la flore yougoslave. *Thèse d'Etat, Université Paris XI, Orsay* (1986).
51. J. G. Valles, T.; Robin, O., Siljak Yakovelv, S., Molecular cytogenetic studies in western Mediterranean *Juniperus* (Cupressaceae). a constant model of GC-rich chromosomal regions and rDNA loci with evidences for paleopolyploidy. *Tree Genetics&Genomes* **11** (2015).
52. N. S. Garcia-Jacas, A.; Ilarsan, R., Aneuploidy in the Centaureinae (Compositae): is n= 7the end of the series? *Taxon* **45** (1996) 39–42.
53. I. J. Leitch, M. W. Chase, M. D. Bennett, Phylogenetic Analysis of DNA C-values Provides Evidence for a Small Ancestral Genome Size in Flowering Plants. *Annals of Botany* **82** (1998) 85–94.
54. M. Font, J. Vallès Xirau, A. Susanna de la Serna, N. Garcia i Jacas, Auto- and allopolyploidy in Centaurea sect. Acrocentron s.l. (*Asteraceae*, Cardueae): karyotype and chromosome banding pattern analyses. Consejo Superior de Investigaciones Científicas **27** (2008) 7–18.

55. S. Siljak-Yakovlev, F. Pustahija, oli, E. M., Boguni, F., Muratovi, E., Ba, N., O. Catrice, S.C. Brown, Towards a Genome Size and Chromosome Number Database of Balkan Flora: C-Values in 343 Taxa with Novel Values for 242. *Advanced Science Letters* **3** (2010) 190–213.
56. D. M. Figueroa, H. W. Bass, A historical and modern perspective on plant cytogenetics. *Briefings in Functional Genomics* **9** (2010) 95–102.
57. J. Valles, M. A. Canela, S. Garcia, O. Hidalgo, J. Pellicer, I. Sanchez-Jimenez, S. Siljak-Yakovlev, D. Vitales, T. Garnatje, Genome size variation and evolution in the family *Asteraceae*. *Caryologia* **66** (2013) 221–235.
58. ANONYMUS, Pravilniku o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim, Narodne novine **99** (2009).
59. M. Ruščić, Flora otoka Brača, *Doktorska dizetracija, biološki odjsek, Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu* (2010).
60. T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burgsen, D. M. More, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb, Flora Europaea 15, *University Press, Cambridge* (1986–1980)-
61. T. G. Tutin, N. A. Burges, A. O. Charter, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb, Flora Europaea 1,2nd edn. *University Press, Cambridge* (1993).
62. R. Hegnauer, Chemical characters in plant taxonomy: some possibilities and limitations. *Pure Appl Chem* **14** (1967) 173–187.
63. R. Hegnauer, Chemical characters in plant taxonomy, Some posibilities and limitations *Phytochemistry* **25** (1986) 1519–1535.
64. M. Bennett, I. Leitch, Nuclear DNA amounts in Angiosperms: Progress, problems and prospects *Annals of Botany* **95** (2005) 45–90.
65. F. Bogunić, S. Siljak-Yakovlev, E. Muratović, F. Pustahija, S. Medjedović, Molecular cytogenetics and flow cytometry reveal conserved genome organization in *Pinus mugo* and *P. uncinata*. *Annals of Forest Science* 68 (2011) 179–187.
66. J. Pellicer, M. F. Fay, I. J. Leitch, The largest eukaryotic genome of them all? *Botanical Journal of the Linnean Society* **164** (2010) 10–15.
67. J. Pellicer, T. Garnatje, J. Molero, F. Pustahija, S. Siljak-Yakovlev, J. Vallès, Origin and evolution of the South American endemic *Artemisia* species (*Asteraceae*): evidence from

molecular phylogeny, ribosomal DNA and genome size data. *Australian Journal of Botany* **58** (2010) 605–616.

68. F. Pustahija, S. Brown, F. Bogunić, N. Bašić, E. Muratović, S. Ollier, O. Hidalgo, M. Bourge, V. Stevanović, S. Siljak-Yakovlev, Small genomes dominate in plants growing on serpentine soils in West Balkans, an exhaustive study of 8 habitats covering 308 taxa. *Plant and Soil* **373** (2013) 427–453.
69. M. Niketić M., S. Siljak-Yakovlev, B. Frajman, M. Lazarević, B. Stevanović, G. Tomović, V. Stevanović Towards resolving the systematics of *Cerastium* subsect. *Cerastium* (Caryophyllaceae): a cytogenetic approach. *Botanical Journal of Linnean Society*, **172** (2013) 205–224.
70. J. Valles, N. Bašić, F. Bogunić, M. Bourge, C. S. Brown, T. Garnatje, A. Hajrudinović, E. Muratović, F. Pustahija, M. E. Šolić, S. Siljak-Yakovlev, Contribution to plant genome size knowledge: first assessments in five genera and 30 species of angiosperms from western Balkans. *Botanica Serbica* **38** (2014) 3–11.
71. M. Bennett, I. Leitch, Nuclear DNA amounts in Angiosperms: Targets, trends and tomorrow *Annals of Botany* **107** (2011) 467–590.
72. J. Doležel, J. Bartoš, H. Voglmayr, J. Greilhuber, Letter to the editor. Cytometry Part A 51A (2003) 127–128.
73. J. Doležel, J. Bartos, H. Voglmayr, J. Greilhuber, Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry A. **51** (2003) 127–128; author reply 129.
74. J. Suda, An employment of flow cytometry into plant biosystematics. *Doctoral thesis. Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague* (2004).
75. J. G. Doležel, J., Suda, J., Flow Cytometry with Plant Cells. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KgaA (2007) 480.
76. S. Garcia, O. Hidalgo, I. Jakovljević, S. Siljak-Yakovlev, J. Vigo, T. Garnatje, J. Vallès, New data on genome size in 128 *Asteraceae* species and subspecies, with first assessments for 40 genera, 3 tribes and 2 subfamilies. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **147** (2013) 1219–1227.
77. S. Siljak Yakovlev, Yakovlev, Y., First data on the karyotype of an Adriatic endemic species *Centaurea ragusina* L., using C-binding and computer program *Le Kromosomo II* **23** (1981) 661–667.

78. M. Bennett, I. Leitch, Nuclear DNA amounts in Angiosperms and their modern uses—807 new estimates *Annals of Botany* **86** (2000) 859–909.
79. T. Garnatje, M. A. Canela, S. Garcia, O. Hidalgo, J. Pellicer, I. Sánchez-Jiménez, S. Siljak-Yakovlev, D. Vitales, J. Vallès, GSAD: A genome size in the *Asteraceae* database. *Cytometry Part A* **79A** (2011) 401–404.
80. N.V. Fedoroff, Transposable Elements, Epigenetics and Genome Evolution, Science 338 (2012) 758–767.
81. M. Dydak, B. Kolano, T. Nowak, D. Siwinska, J. Maluszynska, Cytogenetic studies of three European species of Centaurea L. (*Asteraceae*). Hereditas **146** (2009) 152-161
82. M. Bou Dagher-Kharrat, N. Abdel-Samad, B. Douaihy, M. Bourge, A. Fridlender, S. Siljak-Yakovlev, S. C. Brown, Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **147** (2013) 1228–1237.
83. S. Garcia, I. J. Leitch, A. Anadon-Rosell, M. Á. Canela, F. Gálvez, T. Garnatje, A. Gras, O. Hidalgo, E. Johnston, G. Mas de Xaxars, J. Pellicer, S. Siljak-Yakovlev, J. Vallès, D. Vitales, M. D. Bennett, Recent updates and developments to plant genome size databases *Nucleic Acids Research* **42** (2014) D1159–D1166.
84. P. Kron, J. Suda, B.C. Husband, Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38** (2007) 847–876.
85. J. Greilhuber, J. Dolezel, M. A. Lysak, M. D. Bennett, The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot* **95** (2005) 255–260.
86. L. M. Kolar F, Tešitel J, et al., Glycerol-treated nuclear suspensions-an efficient preservation method for flow cytometric analysis of plant samples. *Chromosome Research* **20** (2012) 303–315.
87. M. A. Calvo, E. A. Arosemena, C. Shiva, C. Adelantado, Antimicrobial activity of plant natural extracts and essential oils, Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances , A Mendes-Vilas (Ed.), Formatex (2011).
88. T. Hartmann, From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68** (2007) 2831–2846.

89. M. Pericone, E. Arace, M.R. Corbo, M. Sinigaglia, A. Bevilacqua, Bioactivity of essential oils: their interaction with food components, Frontiers in Microbiology (2015).
90. T. L. Nakatsu, A., T.; Chinn, J.; Kang, R., Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Product Chemistry* **21** (2000) 571–631.
91. O. Kenny, T. J. Smyth, D. Walsh, C. T. Kelleher, C. M. Hewage, N. P. Brunton, Investigating the potential of under-utilised plants from the *Asteraceae* family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry* **161** (2014) 79–86.
92. L. T. Stryer, J., L.; Berg, J., M., Biochemistry, 5th edition. W. H. Freeman, New York, 2002.
93. P. M. Dewick, Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition. 550, (2009).
94. J. D. Mann, R. S., Hobbs, J. B., Dnathorpe, D. V., Harborne, J. B., Natural Products: their chemistry and biological significance. *Longman Malaysia* (1996) 455.
95. K. Bauer, D. Garbe, H. Surburg, Common Fragnance and Flavor Materials', *VHC Verlagsgesellschaft mbH, Germany* (1990), 218.
96. R. Buttery, D. Maddox, D. Light, L. Ling, Volatile components of Yellow Starthistle *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **34** (1986) 786–788.
97. R. Binder, C. Turner, R. Flath, Comparison of Yellow Starthistle volatiles from different plant parts *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38** (1990) 764–767.
98. D. M. Lazari, H. D. Skaltsa, T. Constantinidis, Volatile constituents of *Centaurea pelia* DC., *C. thessala* Hausskn. subsp. *drakiensis* (Freyn & Sint.) Georg. and *C. zuccariniana* DC. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal* **15** (2000) 7–11.
99. K. Ertugrul, H. Dural, O. Tugay, G. Flamini, P.L. Cioni, L. Morelli, Essential oils from lowers of *Centaurea kotschyi* var. *kotschyi* and *C.kotschyi* var. *decumbens* from Turkey. Flavour Frag. J. **18** (2003) 95–97.
100. F. Senatore, D. Rigano, R. De Fusco, M. Bruno, Volatile components of *Centaurea cineraria* L. subsp *umbrosa* (Lacaita) Pign. and *Centaurea napifolia* L. (*Asteraceae*), two species growing wild in Sicily. *Flavour and Fragrance Journal* **18** (2003) 248–251.
101. Y. Bulent Kose, G. Iscan, B. Demirci, K. H. Baser, S. Celik, Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis Fitoterapia* **78** (2007) 253–254.
102. C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, S. Celik, M. Bruno, S. Rosselli, Volatile constituents of aerial parts of three endemic *Centaurea* species from Turkey: *Centaurea*

amanicola Hub.-Mor., *Centaurea consanguinea* DC. and *Centaurea ptosimopappa* Hayek and their antibacterial activities. *Nat Prod Res*. **22** (2008) 833–839.

103. C. Karamenderes, B. Demirci, K. H. C. Baser, Composition of essential oils of ten Centaurea L. taxa from Turkey. *Journal of Essential Oil Research* **20** (2008) 342–349.

104. Y. B. Köse, B. Demirci, K. H. C. Başer, E. Yücel, Composition of the Essential Oil of Three Endemic Centaurea Species From Turkey. *Journal of Essential Oil Research* **20** (2008) 335–338.

105. F. Senatore, C. Formisano, A. Raio, G. Bellone, M. Bruno, Volatile components from flower-heads of *Centaurea nicaeensis* All., *C.parlatoris* Helder and *C. solstitialis* L. ssp *schouwii* (DC.) Dostal growing wild in southern Italy and their biological activity. *Natural Product Research* **22** (2008) 825–832.

106. A. Altintas, Y. B. Kose, A. Kandemir, B. Demirci, K. H. C. Baser, Composition of the essential oil of *Centaurea saligna*', *Chemistry of Natural Compounds* **45** (2009) 276-77.

107. T. Dob, D. Dahmane, B. Gauriat-Desrdy, V. Daligault, Essential Oil Composition of *Centaurea calcitrapa* L. From Algeria. Journal of Essential Oil Research **21** (2009) 216–219.

108. T. Dob, D. Dahmane, B. Gauriat-Desrdy, V. Daligault, Essential Oil Composition of *Centaurea pullata* L. Journal of Essential Oil Research **21** (2009) 417–422.

109. Y. B. Kose, A. Altintas, B. Demirci, S. Celik, K. H. C. Baser, Composition of the Essential Oil of Endemic *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz From Turkey. *Asian Journal of Chemistry* **21** (2009) 1719–1724.

110. S. Salmanpour, M. A. Khalilzadeh, H. Sadeghifar, Chemical Composition of the Essential Oils From Leaves, Flowers, Stem and Root of *Centaurea zuvandica* Sosn. *Journal of Essential Oil Research* **21** (2009) 357–359.

111. N. Yaylı, A. Yaşar, N. Yaylı, C. Albay, Y. Aşamaz, K. Coşkunçelebi, Ş. Karaoğlu, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea appendicigera* and *Centaurea helenioides*. *Pharmaceutical Biology* **47** (2009) 7–12.

112. A. Altintas, U. Koca, B. Demirci, K. H. C. Baser, Essential oil composition of endemic *Centaurea tchihatcheffii* Fisch and Mey. From Turkey, *Asian Journal of Chemistry* **22** (2010) 4711–4716.

113. C. Formisano, F. Senatore, S. Bancheva, M. Bruno, S. Rosselli, Volatile components from aerial parts of *Centaurea spinosociliata* Seenus ssp *cristata* (Bartl.) Dostal and

Centaurea spinosociliata Seenus ssp *spinosociliata* growing wild in Croatia. *Croatica Chemica Acta* **83** (2010) 403–408

114. T. Milosevic, C. Argyropoulou, S. Solujic, D. Murat-Spahic, H. Skaltsa, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Centaurea pannonica* and *C. jacea*. *Natural product communications* **5** (2010) 1663–1668.
115. A. Tava, S. Esposti, M. Boracchia, L. Viegi, Volatile Constituents of *Centaurea paniculata* Subsp *carueliana* and *C. rupestris* L. (*Asteraceae*) From Mt. Ferrato (Tuscany, Italy). *Journal of Essential Oil Research* **22** (2010) 223–227.
116. L. Viegi, M. Boracchia, R. Cecotti, A. Tava, Volatile components of two endemic species from the Apuan Alps (Tuscany, Italy), *Centaurea arachnoidea* and *C. montis-borlae* (*Asteraceae*). *Natural product communications 5* (2010) 1285–1290.
117. A. Aktumsek, G. Zengin, G. O. Guler, Y. S. Cakmak, A. Duran, 'Screening for *in vitro* antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* species from Turkey flora', *Food and Chemical Toxicology*, 49 (2011), 2914–2920.
118. S. Čavar, M. Maksimović, M. E. Šolić, 'Biological activity and essential oil analysis of endemic *Centaurea gloriosa* Var. *multiflora* Radic *Analytical Chemistry Letters* **1** (2011) 173–180.
119. M. Ben Jemia, C. Formisano, S. Bancheva, M. Bruno, F. Senatore, Chemical composition of the essential oils of *Centaurea formanekii* and *C. orphanidea* Ssp *thessala*, Growing Wild in Greece', *Natural product communications* **7** (2012) 1083–1086.
120. G. Zengin, A. Aktumsek, G. O. Guler, Y. S. Cakmak, Y. Kan, Composition of essential oil and antioxidant capacity of Centaurea drabifolia Sm. subsp detonsa (Bornm.) Wagenitz, endemic to Turkey, NATURAL PRODUCT RESEARCH 26 (2012) 1–10.
121. K. H. C. Baser, B. Demirci, S. Erik, Comparison of the essential oils of different colored *Centaurea tchihatcheffii* Fishc& Mey. Flowers *Turk J. Pharm. Sci* **19** (2013) 313–318.
122. I. Demirtas, A. Sahin, Bioactive volatile content of the stem and root of *Centaurea carduiformis* Dc. Subsp. *carduiformis* Var. *carduiformis Journal of Chemistry* **6** (2013).
123. T. R. Lograda, M.; Chalard, P.; Figueredo, G.; Khalfoune, K.; Silin, H., Phytochemistry, antibacterial activity and chromosome number of *Centaurea solstitialis* L. Grown in Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine* **2** (2013) 675–684.

124. A. Akkurt, S. Celik, 'Composition of the essential oil of some *Centaurea* L', *Asian Journal of Chemistry* **26** (2014) 4912–4914.

125. A. Maggio, L. Riccobono, S. Bancheva, M. Bruno, F. Senatore, Chemical composition of the essential oil of the local endemics *Centaurea davidovii* and *C. parilica* (*Asteraceae*, sect. Lepteranthus) from Bulgaria. *Natural Product Communications* **9** (2014) 1373–1376.

126. T. Erdogan, T. Gonenc, U. Cakilcioglu, B. Kivcak, Fatty Acid Composition of the Aerial Parts of Some *Centaurea* Species in Elazig, Turkey. Tropical Journal of Pharmaceutical Research **13** (2014) 613–616.

127. A. Ertas, A. C. Goren, M. Boga, S. Demirci, U. Kolak, Chemical Composition of The Essential Oils of Three *Centaurea* Species Growing Wild in Anatolia and Their Anticholinesterase Activities *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **17** (2014) 922–926.

128. A. Esmaeili, Z. A. Panahi, M. A. Ebrahimzadeh, Investigation of Phytochemistry of Gene of *Centaurea* Grown in Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants **17** (2014) 806–812.

129. K. Polatoglu, A. Sen, G. Bulut, L. Bitis, N. Goren, Essential Oil Composition of *Centaurea stenolepis* Kerner. from Turkey. Journal of Essential Oil Bearing Plants 17 (2014) 1268–1278.

130. K. Polatoglu, A. Sen, G. Bulut, L. Bitis, N. Goren, Essential Oil Composition of *Centaurea kilaea* Boiss. and *C. cuneifolia* Sm. from Turkey. Nat. Vol & Essent- Oils 1 (2014) 55–59.

131. L. Viegi, R. Cecotti, A. Tava, Essential oilcomposition of some *Centaurea* sp. (Asteracea) from different Italian islands. *Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., Serie B* **121** (2014) 93–100.

132. M. B. Jemia, F. Senatore, M. Bruno, S. Bancheva, Components from the Essential oil of *Centaurea aeolica* Guss. and *C.diluta* Aiton from Sicily, Italy. *Records of Natural Products* **9** (2015) 580–585.

133. A. S. Yaglioglu, I. Demirtas, Comparative Essential Oil Composition of Flowers, Leaves, and Stems of *Centaurea polypodiifolia* var. *polypodiifolia*. *Chemistry of Natural Compounds* **51** (2015) 982–984.

134. K. Carović-Stanko, Z. Liber, O. Politeo, F. Strikić, I. Kolak, M. Miloš, Z. Šatović, Molecular and chemical characterization of the most widespread Ocimum species, *Plant systematics and evolution* **294** (2011) 253**–**262.

135. Z. Liber, K. Carović-Stanko, O. Politeo, F. Strikić, I. Kolak, M. Milos, Z. Satovic, Chemical characterization and genetic relationships among Ocimum basilicum L. cultivars, *Chemistry & biodiversity* **8** (2011) 1978–1989.

136. S. Alvarenga, M. Ferreira, G. Rodrigues, V. Emerenciano, A general survey and some taxonomic implications of diterpenes in the *Asteraceae Botanical Journal of the Linnean Society* **147** (2005) 291–308.

137. T. Milosevic Ifantis, S. Solujic, D. Pavlovic-Muratspahic, H. Skaltsa, Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance. *Phytochemistry* **94** (2013) 159–170.

138. K. A. Hammer, C. F. Carson, T. V. Riley, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, Journal of Applied Microbiology 86 (1999) 985–990.

139. S. Bessada, J. Barreira, M.B. Oliveira, *Asteraceae* species with most prominent bioactivity and their potential applications: A Review *Industrial Crops and Products* **76** (2015) 604–615.

140. E. Altundag, M. Ozturk, Ethnomedicinal studies on the plant resources of East Anatolia, Turkey *Procedia - Social and Behavioral Sciences* **19** (2011) 756–777.

141. B. Ozcelik, I. Gurbuz, T. Karaoglu, E. Yesilada, Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiological Research* **164** (2009) 545–552.

142. E. Sezik, E. Yesilada, G. Honda, Y. Takaishi, Y. Takeda, T. Tanaka, Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia, *Journal of Ethnopharmacology* **75** (2001) 95–115.

143. M.R. Gonzalez-Tejero, M. Casares-Porcel, C.P. Sanchez-Rojas, J.M. Ramiro-Gutierrez, J. Molero-Mesa, A. Pieroni, M.E. Giusti, E. Censorii, C. de Pasquale, A. Della, D. Paraskeva-Hadijchambi, A. Hadjichambis, Z. Houmani, M. El-Demerdash, M. El-Zayat, M. Hmamouchi, S. ElJohrig, Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia, *Journal of Ethnopharmacology* **116** (2008) 341–357.

144. U. Cakilcioglu, I. Turkoglu, An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazıg-Turkey), *Journal of Ethnopharmacology* **132** (2010) 165–175.

145. P. H. Axelsen, H. Komatsu, I. V. Murray, Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's Disease *Physiology* **26** (2011) 54–69.

146. P. D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* **24** (2012) 981–990.

147. M. Antolovich, P. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, Methods for testing antioxidant activity *Analyst* **127** (2002) 183–198.

148. M. Serafini, Back to the origin of the 'antioxidant hypothesis': the lost role of the antioxidant network in disease prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86** (2006) 1989–1991.

149. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship, *Journal of Nutritional Biochemistry* **13** (2002) 572–584.

150. B. H. Havsteen, The biochemistry and medicinal significance of the flavanoids, *Pharmacology & Therapeutics* **96** (2002) 67–202.

151. I. Mudnić, D. Modun, V. Rastija, J. Vuković, I. Brizić, V. Katalinić, B. Kozina, M. Medić-Šarić, M. Boban, Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine, *Food Chemistry* **119** (2010) 1205–1210.

152. O. Politeo, M. Jukić, M. Miloš, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Free Volatile Aglycones from Laurel (Laurus nobilis L.) Compared to Its Essential Oil, *Croatica Chemica Acta* **80** (2007) 121–126.

153. D. A. Butterfield, J. D. Pocernich, A. Castegna, Evidence of oxidative damage in Alzheimer's Disease brain: Central role for amyloid β-peptide *Trends in Molecular Medicine* **7** (2001) 548–554.

154. F. Amenta, S. K. Tayebati, Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction, *Curr Med Chem* **15** (2008) 488–498.

155. P. J. Houghton, Y. Ren, M. J. Howes, Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep* **23** (2006) 181–199.

156. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **62** (2011) 175–190.

157. G. Perry, A. D. Cash, M. A. Smith, Alzheimer disease and oxidative stress. *BioMed Research International* **2** (2002) 120–123.

158. T. Zhao, K.-m. Ding, L. Zhang, X.-m. Cheng, C.-h. Wang, Z.-t. Wang, Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities of β-

Carboline and Quinoline Alkaloids Derivatives from the Plants of Genus Peganum. Journal of Chemistry **6** (2013).

159. Z. Kovarik, Z. Radić, H. Berman, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, P. Taylor, Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *The Biochemical Journal*. **373** (2003) 33–40.

160. Enzyme Nomenclature (1992) Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Bioligy, Academic Press Inc., San Diego.

161. I. S. Orhan, B., Acetylcholinesterase Inhibitors from Natural Resoruces *J. Pharm. Sci* **28** (2003) 51–58.

162. M. Adams, F. Gmunder, M.Hamburger, Plants traditionally used in age related brain disorders – A survey of ethnobotanical literature, *Journal of Ethnopharmacology* **113** (2007) 363–381.

163. M. J. Howes, P. Houghton, Plants use in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **75** (2003) 513–527.

164. M. Mehta, A. Adem, M. Sabbagh New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease *International Journal of Alzheimer's Disease* **2012** (2012).

165. J. Dupuis, T. Louis, M. Gauthier, V. Raymond, Insights from honeybee (Apis mellifera) and fly (Drosophila melanogaster) nicotinic acetylcholine receptors: from genes to behavioral functions. Neurosci Biobehav Rev **36** (2012) 1553–1564.

166. K. Bush, Proliferation and significance of Clinically Relevant Beta-Lactamases *Ann N Y Acad Sci* (2013) 12023.

167. C. H. Pohl, J. L. Kock, V. S. Thibane, Antifungal free fatty acids: a review. *Science against microbial pathogens: current research and technological advances* **1** (2011) 61–71.

168. O. Politeo, I. Botica, T. Bilusic, M. Jukic, I. Carev, F. Burcul, M. Milos, Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species Pinus nigra Arnold ssp dalmatica (Vis.) Franco. *Journal of Medicinal Plants Research* **5** (2011) 6590–6596.

169. D. A. Scoog, J. Holler, Osnove analitičke kemije *Školska knjiga, Zagreb* (1999) 952.

170. R. Majors, Şample preparation fundamentals for chromatography. *Agilen Technologies, Canada* (2013) 355.

171. J. Mastelić, I. Jerković, Application of co-distillation with superheated pentane vapour to the isolation of unstable essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* **18** (2003) 521–526.

172. S. Pine, Organska kemija *Školska knjiga, Zagreb* (1994) 1203.

173. E. R. Chamorro, S. N. Zambón, A. W. Morales, A. F. Sequeira, G.A.Velasco, Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography, *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*, Dr. Bekir Salih (Ed.), ISBN: 978-953-51-0127-7, InTech (2012).

174. M. N. Alam, N. J. Bristi, M. Rafiquzzaman, 'Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity', *Saudi Pharmaceutical Journal* **21** (2013) 143–152.

175. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset,'Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity *LWT - Food Science and Technology* **28** (1995) 25-30.

176. D. W. Galbraith, K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma, E. Firoozabady, Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues *Science* **220** (1983) 1049–1051.

177. R. P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography - mass spectrometry *Allured publishing corporation: Carol Stream, IL, USA,* 4th Ed (2007).

178. Clinical and Laboratory Standards Institute 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA

179. N. Garcia-Jacas, A. Susanna, R. Ilarslan, H. Ilarslan, New chromosome counts in the subtribe Centaureinae (*Asteraceae*, Cardueae) from West Asia. *Botanical Journal of the Linnean Society* **125** (1997) 343–349.

180. Z. Sekovski, M. Jovanovska Chromosome atlas of some Macedonian angiosperms. IV. *Ann. Fac. Biol. Univ. Skopje.* **36** (1983) 73–86.

181. M. Bona, An overview to *Centaurea* S.l. (*Asteraceae*) based on herbarium specimens of iste J. Fac. Pharm. Istanbul **43**(2013) 121-137

182. S. M. Ghaffari, Chromosome studies in Iranian Compositae *Iran. J. Bot.* **4** (1989) 189–196.

183. T. R. Tonian, Relation between chromosome number and some morphological features of Centaureinae Less representatives. Rev. Biol. 33 (1980) 552–554.

184. S. U. Savelev, E. J. Okello, E. K. Perry, Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of Salvia species and their constituents. Phytotherapy Research 18 (2004) 315–324.

185. S. Savelev, E. Okello, N. S. Perry, R. M. Wilkins, E. K. Perry, Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in Salvia lavandulaefolia essential oil. Pharmacol Biochem Behav 75 (2003) 661–668.

186. N. S. Perry, P. J. Houghton, A. Theobald, P. Jenner, E. K. Perry, In-vitro Inhibition of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase by Salvia lavandulaefolia Essential Oil and Constituent Terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **52** (2000) 895–902.

187. M. Katalinic, G. Rusak, J. Domacinovic Barovic, G. Sinko, D. Jelic, R. Antolovic, Z. Kovarik, Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *Eur J Med Chem* **45** (2010) 186–192.

188. P. K. Mukherjee, V. Kumar, M. Mal, P. J. Houghton, Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* **14** (2007) 289–300.

189. E. A. P. Ivanova, Natalija; Kungulovski, Džoko Antimicrobial activities of laboratory produced essential oil solutions against five selected fungal strains *Journal of Natural Sciences, Matica Srpska*, Novi Sad **124** (2013) 171–183.

190. C. Q. Sun, C. J. Connor, A. M. Roberton, Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **36** (2003) 9–17.

191. L. Rajabi, C. Courreges, J. Montoya, R. Aguilera, T. Primm, Acetophenones with selective antimycobacterial activity. *Letters in applied microbiology* **40** (2005) 212–217.

192. Y. Inoue, T. Hada, A. Shiraishi, K. Hirose, H. Hamashima, S. Kobayashi, Biphasic Effects of Geranylgeraniol, Teprenone, and Phytol on the Growth of Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49** (2005) 1770–1774.

193. B. Pejin, A. Savic, M. Sokovic, J. Glamoclija, A. Ciric, M. Nikolic, K. Radotic, M. Mojovic, Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. *Nat Prod Res.* **28** (2014) 372–376.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Mila Gora 1
21213 Kaštel Gomilica
+38521329430
+385911678511
ivana.carev@ktf-split.hr
hr.linkedin.com/in/ivanacarev

OBRAZOVANJE

- 2009–2016. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, poslijediplomski doktorski studij kemije, smjer biokemija.
- 1999–2005. Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, diplomski studij biologije i kemije; **prof. biologije i kemije**, naslov diplomskog rada:

Bogić, Ivana: Aktivnost superoksid dismutaze u listovima masline (Olea europea L.) pod utjecajem solnog stresa / diplomski rad. Split: Fakultet prirodoslovno-matematičkih znanosti i odgojnih područja u Splitu, 13. 7. 2005, 65 str. *Voditelj: Pavela-Vrančič, Maja*.

- 2001–2005. Sveučilište Molise, Italija, preddiplomski Međunarodni studij Znanosti i tehnologije okoliša: **B.Sc. Science and Technology of the Environment and Territory,** naslov diplomskog rada:

Bogić, Ivana: Effect of salinity stress on watermelon [Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum & Nakai] / diplomski rad. Split, Isernia, Targoviste: Science and Technology of the Environment and Territory, 18. 3. 2005, 55 str. *Voditelji: Pavela-Vrančić, Maja. Scippa, G. Stefania*.

RADNO ISKUSTVO:

- ***znanstvena novakinja/asistentica:***

Kemijsko-tehnološki fakultet; Zavod za biokemiju; Ruđera Boškovića 35; 21 000 Split (2009. do danas)

- **znanstveno-istraživački rad na projektima:**

1. Nacionalni projekt: **"***IP-2014-09-6897 Istraživanje bioaktivnih spojeva iz dalmatinskog bilja: njihov antioksidacijski karakter i utjecaj na enzimsku inhibiciju i zdravlje*" voditelja prof. dr. sc. Mladena Miloša, financiran od Hrvatske zaklade za znanost Republike Hrvatske (2015. do danas).
2. Nacionalni projekt: «*Antioksidacijski sastojci i inhibitori kolinesteraza iz aromatičnog bilja»*, pod šifrom *011-2160547-1330*, voditelja prof. dr. sc. Mladena Miloša, financiran od Ministarstva znanosti obrazovanja i športa Republike Hrvatske (2009–2013).
3. Međunarodni projekt: *"The role of cholinesterases in cell differentiation and their inhibition by flavonoids and flavonoid-metal complexes"*, voditeljice prof. dr. sc. Gordane Rusak, u koji su bili uključeni Kemijsko–tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Prirodoslovno–matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Tehničko sveučilište iz Dresdena, Njemačka; financiran od Nacionalne zaklade za znanost, Republike Hrvatske (2009–2010).
4. Međunarodni projekt: *"Chemical and biological observation of selected plant species of Croatia"*, voditeljica Ivana Carev, prof.; proveden 2013. na Sveučilištu Paris Sud, Pariz i francuskom nacionalnom istraživačkom centru C.N.R.S. u Orsayu, pod mentorstvom prof. Sonje Šiljak Yakovlev, financiran od Francuske vlade (2013).

- **nastava na kolegijima**: *Biokemija* (Sveučilišni preddiplomski studij kemijske-tehnologije; smjer zaštita okoliša i smjer mediteranske kultur); *Biokemija I* (Sveučilišni preddiplomski studij kemije); *Osnove biokemije* (Stručni studij kemijske tehnologije, smjer: prehrambena-tehnologija); *Opća biokemija* (Integrirani sveučilišni studij farmacije); *Uvod u molekularnu biologiju* (Sveučilišn diplomski studij kemije, smjer: organska kemija i biokemija); *Biokemija* (Stručni sveučilišni zdravstveni studij)
- **projekti vezani za studentski angažman:**

1. Međunarodni projekt: "*Students learn citizenship - Service-Learning for Nature Conservation and Environmental Protection*" projekt Udruge za prirodu, okoliš i održivi razvoj Sunce u suradnji s Njemačkom Zakladom za zaštitu okoliša, The Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) i Ekonomskog fakulteta, Filozofskog fakulteta, Kemijsko-tehnološkog fakulteta i Odjela za studij mora Sveučilišta u Splitu (2016. do danas).

2. Nacionalni projekt: "*Basic Skills Workshop*" za razvoj vještina prezentiranja, pisanja životopisa, motivacijskog pisma i priprema za razgovor za posao. Projekt su podržali Hrvatsko kemijsko društvo-Split i Alumni KTF-a (2014. do danas).
3. Međunardni projekt: "*Competitive Croatian Higher Education for Better Employment*", trenerica za priznavanje i vrednovanje neformalnih i informalnih oblika učenja; pod vodstvom Agencije za znanost i visoko obrazovanje, Republike Hrvatske, financiran od Europske komisije, (2015)**.**

- **projekti popularizacije znanosti:**

1. Aktivnosti promidžbe Kemijsko-tehnološkog fakulteta (2009. do danas)
2. Festival znanosti (2009. do danas)
3. Noć istraživača, projekt EU financiran kroz program *Horizon 2020* (2013–2015)

- **Agencija za znanost i visoko obrazovanje**: članica povjerenstva za reakreditaciju poslijediplomskih sveučilišnih studijskih programa.

- profesorica biologije i kemije

Osnovna škola «Knez Trpimir», Kaštel Gomilica; Osnovna škola «Knez Mislav», Kaštel Sućurac; Osnovna škola «Bijaći», Kaštel Novi.

Udruga za prirodu, okoliš i održivi razvoj SUNCE (izvoditeljica i voditeljica na projektima zaštite prirode i okoliša; «*Nacionalna platforma za praćenje europskih integracija na području očuvanja prirode i zaštite okoliša*», financiran od Nacionalne zaklade za razvoj civilnog društva; «*Odgovorni turizam i ekoregijska zaštita Srednje i Južne Dalmacije*", financiran od WWF-a i SIDA-a; «*Raising public awareness for implementing sustainable management of bathing areas in Croatia*», financiran od Europske komisije; «*Bioraznolikost Dalmacije - upoznajmo danas da imamo sutra*», financiran od Ministarstva kulture; «*Sunce za djecu – projekt odgoja i obrazovanja za prirodu i okoliš*», financiran od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa i Zagrebačke banke; «*Istraživanje vidre u Dalmaciji*», financiran od Državnog zavoda za zaštitu prirode; «*Od nužnog zla do korisnog dobra II*», financiran od Minstarstva zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva; „*Centar znanja*", financiran od Splitsko – dalmatinske županije; *«Important Plant Area – Pantan (Područja važna za floru – Pantana)»*, financiran od Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Zagrebu kao pilot projekta „IPA Hrvatska").

USAVRŠAVANJA I DODATNO OBRAZOVANJE:

- Ljetna škola: 10th summer school „Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine“ (MSBM), Dubrovnik, Hrvatska, 2016.
- Program edukacije MBSDr: Managerial/Business Skills Development for Researchers **(**Razvoj menadžerskih/poslovnih vještina za istraživače), koji se provodio u Centre of Excellence for Biosensors, Instrumentation and Process Control, COBIK, u Sloveniji u sklopu PACINNO projekta, 2014–2015.
- Instrumentalia&Waters Analytical Solutions workshops: „From preparation to LC-MS/MS analysis“; New trends in LC i LC-MS/MS Analysis, 2013–2015.
- Radionice „Self-Management"; „Career-Building"; „Leadership" and „Professional Effectiveness"; kao dio projekta "The modernization of doctoral education through the implementation of the Croatian Qualifications Framework (MODOC)" financiranog od Europske komisije, 2014.
- Radionica o intelektualnom vlasništvu i pravima, Ured za transfer tehnologije Split i European IPR Helpdesk, 2013.

STIPENDIJE, NAGRADAE I PRIZNANJA:

- Stipendija Francuskog društva biokemije i molekularne biologije za sudjelovanje na *FEBS-EMBO* konferenciji u Parizu, 2014.
- Stipendija Francuske Vlade za znanstveno-stručno usavršavanje u Francuskoj, 2013.
- Diplomirala s najvećom ocjenom uz pohvalu (110, cum laude) na međunarodnom studiju „Science and Technology of the Environment and Territory“
- Stipendija grada Kaštela 1999–2005.

ČLANSTVA:

- Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, Zagreb, članica
- Hrvatsko kemijsko društvo, Zagreb i Split, članica
- Alumi Kemijsko-tehnološkog fakulteta, Split, članica Predsjedništva
- Udruga za prirodu okoliš i održivi razvoj Sunce, Split, aktivna članica
- Klub trudnica i roditelja Split, volonterka, savjetnica za dojenje
- Hrvatsko planinarsko društvo „Ante Bedalov“, Kaštel Kambelovac članica Izvršnog odbora

VJEŠTINE:

- engleski jezik (aktivno u pismu i govoru), talijanski jezik (početnica)
- vozačka dozvola, B kategorija
- organizacijske vještine
- završen tečaj fotografije
- završena planinarska škola, predavačica u planinarskim školama
- savjetnica za dojenje, voditeljica edukacije za savjetnice za dojenje, volonterka na projektu „Znanjem do poroda bez straha“.

RADOVI I PUBLIKACIJE:

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima koje citira Current Content

1. Politeo, Olivera; Skočibušić, Mirjana; **Carev, Ivana**; Burčul, Franko; Jerković, Igor; Sarolić, Mladenka; Miloš, Mladen. Phytochemical Profiles of Volatile Constituents from *Centaurea ragusina* Leaves and Flowers and their Antimicrobial Effects. // Natural product communications. 7 (2012) , 8; 1087–1090. (članak, znanstveni).
2. Politeo, Olivera; Skočibušić, Mirjana; Burčul, Franko; Maravić, Ana; **Carev, Ivana**; Ruščić, Mirko; Miloš, Mladen. *Campanula portenschlagiana* Roem. et Schult.: Chemical and Antimicrobial Activities//Chemistry&Biodiversity 10 (2013), 6; 1072–1080 (članak, znanstveni).
3. **Carev, Ivana**; Ruščić, Mirko, Skočibušić, Mirjana, Maravić, Ana, Siljak-Yakovlev, Sonja; Politeo, Olivera: Phytochemical and cytogenetic characterization of *Centaurea solstitialis* L. (Asteraceae) from Croatia//Chemistry&Biodiversity (2016) (članak, znanstveni, *u postupku recenzije*).

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u Science Citation Index bazi podataka

4. Jukić, Mila; Burčul, Franko; **Carev, Ivana**; Politeo, Olivera; Miloš, Mladen. Screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of selected plants from Croatia//Natural product research 26 (2012), 18; 1703–1707. (članak, znanstveni).
5. Politeo, Olivera; Botica, Irena; Bilušić, Tea; Jukić, Mila; **Carev, Ivana**; Burčul, Franko; Miloš, Mladen. Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco//Journal of Medicinal Plants Research. 5 (2011) , 30; 6590–6596 (članak, znanstveni).

KONGRESNA PRIOPĆENJA (SAŽECI) U CC-ČASOPISU:

1. **Carev, Ivana**; Ruščić, Mirko; Politeo, Olivera; Brown, Spencer C; Siljak-Yakovlev, Sonja Genome size and chromosome number in some *Centaurea* (*Asteraceae*) from Croatia // *The FEBS Journal* 281 (2014) 252-252// FEBS-EMBO 2014 Conference Paris, Francuska, 2014.
2. Stankovic, M. S., Jukić, M., Burčul, F., Miloš, M., Politeo, O., **Carev, I.,** 2011. Biological effects and phenolic content of felty germander (Teucrium polium L. subsp polium). Planta Med. 77, 1397–1397.

SAŽECI U ZBORNICIMA SKUPOVA:

1. **Ivana Carev**, Ana Maravic, Mirko Ruscic, Mirjana Skocibusic, Olivera Politeo. Chemical composition and antimicrobial potential of *Centaurea solstitialis* volatile compounds. 16th Ružička days Today Science – tomorrow Industry, Vukovar, 2016. (poster, sažetak, znanstveni).
2. Mejra Bektašević, **Ivana Carev**, Franko Burčul, Mila Radan, Olivera Politeo. Endemska *Satureja subspicata* L. – kemijski profil i biološka aktivnost eteričnog ulja. 16th Ružička days Today Science – tomorrow Industry, Vukovar, 2016. (poster, sažetak, znanstveni).
3. **Ivana Carev**, Mirko Ruščić, Sonja Siljak-Yakovlev, Olivera Politeo. "Cytogenetic and phytochemical characterization of *Centaurea solstitialis* L. from Croatia", kongres Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju – HDBMB 2016, Split (poster, sažetak, znanstveni).
4. **Ivana Carev**, Mejra Bektašević, Sonja Siljak Yakovlev, Olivera Politeo Fitokemijski i citogenetski profil biljke *Centaurea solstitalis* L., Simpozij doktorski studenata PMF-a, 2016. Zagreb (poster, sažetak, znanstveni).
5. Politeo, Olivera; Ivana, Brahović, **Ivana, Carev** "Superoxide radical scavenging properties of volatile compounds from plants of *Centaurea* genus". Skup hrvatskih kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, 2015. (poster, sažetak, znanstveni).
6. Politeo, Olivera; **Carev, Ivana**; Burčul, Franko; Ruščić, Mirko; Miloš, Mladen. *Campanula portenschlagiana* Roem et Schult.: kemijski i biološki profil hlapljivih frakcija eteričnog ulja//2013. *Hrvatski botanički kongres*. Split, Hrvatska (poster, domaća recenzija, sažetak).

7. Burčul, Franko; **Carev, Ivana**; Jukić, Mila; Politeo, Olivera; Mlioš, Mladen; Dražić, Antonia. Acetylcholinesterase inhibitory effects of the essential oil of Nigella sativa L. seeds and its selected components//13th Ružička days Today Science – tomorrow Industry, Book of Abstracts/Šubarić, Drago (ur.). Osijek, 2010. 11-11 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
8. **Carev, Ivana**; Ferhatović, Lejla; Politeo, Olivera; Burčul, Franko; Jukić, Mila; Miloš, Mladen. Biological activity of extracts from selected *Asteraceae* plant species//13th Ružička days Today Science – tomorrow Industry, Book of Abstracts/Šubarić, Drago (ur.), Osijek: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2010. 102–102. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
9. **Carev, Ivana**; Skroza, Danijela; Generalić, Ivana; Burčul, Franko; Muštra, Jelena. Antioksidacijski profil galne kiseline//VII. susret mladih kemijskih inženjera 2010, Knjiga sažetaka/Bolf, Nenad ; Šoljić Jerbić, Ivana (ur.). Zagreb : Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebuu, 2010. 22–22. (predavanje,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
10. Politeo, Olivera; **Carev, Ivana**; Burčul, Franko; Jukić, Mila; Ajduković, Petra; Tadijana, Vrdoljak; Miloš, Mladen. Screening of antiacetylcholineesterase and antioxidant activity of extracts from selected Croatian plants //2010. (poster, sažetak).
11. Politeo, Olivera; **Carev, Ivana**; Burčul, Franko; Jukić, Mila; Bilušić, Tea; Miloš, Mladen. Evaluation of antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. dalmatica (Vis.) Franco//Programme and Abstracts: 10th International Meeting on Cholinesterases/Kovarik, Zrinka (ur.). Zagreb: ITG tiskara, 2009. 132–133. (poster, sažetak, znanstveni).