

# Inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze eteričnim uljima biljaka iz porodice lamiaceae

---

Džidara, Ena

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:281714>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**INHIBICIJA ENZIMA  $\alpha$ -AMILAZE ETERIČNIM ULJIMA**  
**BILJAKA IZ PORODICE LAMIACEAE**  
**ZAVRŠNI RAD**

**ENA DŽIDARA**  
**MATIČNI BROJ: 101**

**Split, rujan 2022.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDIPLOMSKI STUDIJ**  
**PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**INHIBICIJA ENZIMA  $\alpha$ -AMILAZE ETERIČNIM ULJIMA**  
**BILJAKA IZ PORODICE LAMIACEAE**  
**ZAVRŠNI RAD**

**ENA DŽIDARA**  
**MATIČNI BROJ: 101**

**Split, rujan 2022.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
UNDERGRADUATE STUDY  
FOOD TECHNOLOGY**

**INHIBITION OF  $\alpha$ -AMYLASE ENZYME BY ESSENTIAL OILS  
FROM PLANTS OF LAMIACEAE FAMILIES  
BACHELOR THESE**

**ENA DŽIDARA  
Parent number: 101**

**Split, September 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Studij Prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada: je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: prof. dr. sc. Olivera Politeo

Pomoć pri izradi:

### INHIBICIJA ENZIMA $\alpha$ -AMILAZE ETERIČNIM ULJIMA BILJAKA IZ PORODICE LAMIACEAE

Ena Džidara, broj ineksa 101

**Sažetak:** Današnjim načinom života iz dana u dan globalno raste prisutnost nekih ne zaraznih bolesti, kao što su Alzheimerova bolest, *Diabetes mellitus* i pretilost. Potreba za mjerama u borbi protiv ovih bolesti posljednjih je godina, diljem svijeta, potakla povećan broj istraživanja s ciljem otkrivanja novih prirodno prisutnih aktivnih spojeva sa svojstvima korisnim za ljudsko zdravlje. Usporavanje probave škroba inhibicijom enzima kao što je  $\alpha$ -amilaza igra ključnu ulogu u kontroli ove bolesti. Mnoga provedena istraživanja potvrdila su hipoglikemijski učinak eteričnih ulja i sve ukupnu dobrobit na zdravlje. Cilj ovog rada je pregledati literaturu provedenih istraživanja na temu eteričnih ulja biljaka porodice Lamiaceae koji djeluju kao inhibitori enzima  $\alpha$ -amilaze, čije djelovanje može imati učinak kod osoba koje boluju od dijabetesa. S ovim ciljem su pregledana dostupna i relevantna znanstvena literatura; baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*. Rezultati su pokazali da su eterična ulja biljaka porodice Lamiaceae važan i značajan izvor spojeva s inhibicijskim učinkom na enzim  $\alpha$ -amilaza.

**Ključne riječi:** dijabetes, inhibicijska aktivnost,  $\alpha$ -amilaza, eterična ulja, Lamiaceae

**Rad sadrži:** 59 stranica, 19 slika, 16 tablica, 44 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. izv.prof.dr.sc. Lea Kukoč Modun - predsjednik
2. doc.dr.sc. Franko Burcul- član
3. prof. dr. sc. Olivera Politeo - član-mentor

**Datum obrane:** 16.rujna.2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**

**Faculty of Chemistry and Technology Split Study**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.25.

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

**Technical assistance:**

### INHIBITION OF $\alpha$ -AMYLASE ENZYME BY ESSENTIAL OILS FROM PLANTS OF LAMIACEAE FAMILIES

**Ena Džidara , index number 101**

**Abstract:** With today's lifestyle, the presence of some non-communicable diseases, such as Alzheimer's disease, Diabetes mellitus and obesity, is increasing globally. The need for measures to combat these diseases has, in recent years, stimulated an increased number of researches with the aim of discovering new naturally occurring active compounds with properties beneficial to human health all over the world. Slowing down the digestion of starch by inhibiting enzymes such as  $\alpha$ -amylase plays a key role in controlling this disease. Many studies have confirmed the hypoglycemic effect of essential oils and the overall health benefits. The aim of this paper is to review the literature of research conducted on the subject of essential oils of plants of the Lamiaceae family that act as inhibitors of the enzyme  $\alpha$ -amylase, whose action can have an effect on people suffering from diabetes. With this aim, the available and relevant scientific literature from *Web of Science Core Collection* and *Scopus* databases was reviewed. The results showed that the essential oils of plants of the Lamiaceae family are an important and significant source of compounds with an inhibitory effect on the  $\alpha$ -amylase enzyme.

**Keywords:** *diabetes, inhibitory activity,  $\alpha$ -amylase, essential oils, Lamiaceae*

**Thesis contains:** 59 pages, 19 figures, 16 tables, 44 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

- 1. Ph. D. izv.prof.dr.sc. Lea Kukoč Modun, Associate professor chair person**
- 2.Ph. D. doc.dr.sc. Franko Burcul, Assistant professor member**
- 3.Ph. D. prof. dr. sc. Olivera Politeo, Full professor supervisor**

**Defence date:** 16<sup>th</sup> September 2022.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited** in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Olivere Politeo, u razdoblju od srpnja do rujna 2022. godine.*

*Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Oliveri Politeo na iskazanoj pomoći, razumijevanju i savjetima koji su mi pomogli tijekom izrade ovoga rada. Također se zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i ljubavi.*



## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljima biljaka porodice Lamiaceae.  $\alpha$ -Amilaza je jedan od važnih enzima u procesu probave ugljikohidrata, a samim tim je važan u patogenezi dijabetesa. Od ove bolesti u suvremenom svijetu oboljeva veliki dio populacije. Obzirom da lijekovi koji se koriste u liječenju sadrže i stanovite nuspojave neprestalno se traže iz prirode izolirani inhibitori ovog enzima s ciljem moguće prevencije i/ili tretmana dijabetesa. Kao izvori podataka koristile su se dostupne relevantne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*.

## SAŽETAK

Današnjim načinom života iz dana u dan globalno raste prisutnost nekih ne zaraznih bolesti, kao što su Alzheimerova bolest, *Diabetes mellitus* i pretilost. Potreba za mjerama u borbi protiv ovih bolesti posljednjih je godina, diljem svijeta, potakla povećan broj istraživanja s ciljem otkrivanja novih prirodno prisutnih aktivnih spojeva sa svojstvima korisnim za ljudsko zdravlje. Usporavanje probave škroba inhibicijom enzima kao što je  $\alpha$ -amilaza igra ključnu ulogu u kontroli ove bolesti. Mnoga provedena istraživanja potvrdila su hipoglikemijski učinak eteričnih ulja i sve ukupnu dobrobit na zdravlje. Cilj ovog rada je pregledati literaturu provedenih istraživanja na temu eteričnih ulja biljaka porodice Lamiaceae koji djeluju kao inhibitori enzima  $\alpha$ -amilaze, čije djelovanje može imati učinak kod osoba koje boluju od dijabetesa. S ovim ciljem su pregledana dostupna i relevantna znanstvena literatura; baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*. Rezultati su pokazali da su eterična ulja biljaka porodice Lamiaceae važan i značajan izvor spojeva s inhibicijskim učinkom na enzim  $\alpha$ -amilaza.

**Ključne riječi:** dijabetes, inhibicijska aktivnost,  $\alpha$ -amilaza, eterična ulja, Lamiaceae

## **SUMMARY**

With today's lifestyle, the presence of some non-communicable diseases, such as Alzheimer's disease, Diabetes mellitus and obesity, is increasing globally. The need for measures to combat these diseases has, in recent years, stimulated an increased number of researches with the aim of discovering new naturally occurring active compounds with properties beneficial to human health all over the world. Slowing down the digestion of starch by inhibiting enzymes such as  $\alpha$ -amylase plays a key role in controlling this disease. Many studies have confirmed the hypoglycemic effect of essential oils and the overall health benefits. The aim of this paper is to review the literature of research conducted on the subject of essential oils of plants of the Lamiaceae family that act as inhibitors of the enzyme  $\alpha$ -amylase, whose action can have an effect on people suffering from diabetes. With this aim, the available and relevant scientific literature from *Web of Science Core Collection* and *Scopus* databases was reviewed. The results showed that the essential oils of plants of the Lamiaceae family are an important and significant source of compounds with an inhibitory effect on the  $\alpha$ -amylase enzyme.

**Keywords:** *diabetes, inhibitory activity,  $\alpha$ -amylase, essential oils, Lamiaceae*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
1.1 $\alpha$ -Amilaza.....	4
1.1.1 Mehanizam djelovanja $\alpha$ -amilaze.....	5
1.1.2 Metabolički poremećaji .....	6
1.1.3 Biljni inhibitori $\alpha$ -amilaza .....	8
1.2 Eterično ulje .....	12
1.2.1 Kemijski sastav eteričnih ulja.....	13
1.3 Obitelj Lamiaceae .....	18
1.3.1 Terapijski učinci .....	19
EKSPREIMENTALNI DIO .....	23
2. MATERIJAL I METODE .....	25
2.1 Test inhibicije enzima $\alpha$ -amilaze Caraway–Somogyi jod / kalij jodid metodom.....	26
2.2 Test inhibicije enzima $\alpha$ -amilaze DNSA metodom .....	26
2.3 Test inhibicije enzima $\alpha$ -amilaze CNPG3 (2-kloro- <i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ - <i>D</i> -maltotriozid) metodom.....	28
2.5 Spektrofotometrija.....	29
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	30
4. ZAKLJUČAK.....	50
LITERATURA .....	54

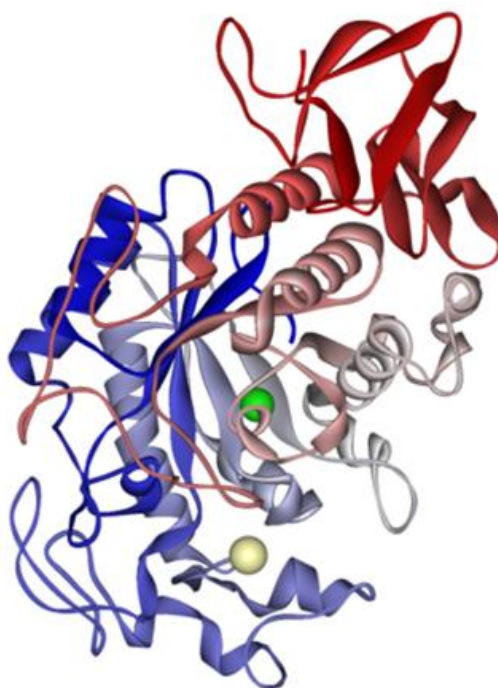
## **1. UVOD**

Današnjim načinom života iz dana u dan globalno raste prisutnost nekih nezaraznih bolesti, kao što su Alzheimerova bolest, *Diabetes mellitus* (dijabetes) i pretilost. Potreba za mjerama u borbi protiv ovih bolesti (1) posljednjih je godina, diljem svijeta, potakla povećan broj istraživanja s ciljem otkrivanja novih prirodno prisutnih aktivnih spojeva sa svojstvima korisnim za ljudsko zdravlje (2).

Dijabetes je metabolički poremećaj uzrokovan oštećenjem djelovanja ili izlučivanja inzulina. Uočeno je da visoki šećer u krvi također uzrokuje povećanje slobodnih radikala i smanjenje antioksidativnih markera. Slobodni radikali i unutarstanični antioksidativni mehanizmi igraju važnu ulogu u patogenezi dijabetesa i Alzheimerove bolesti (3). Stoga, usporavanje probave škroba inhibicijom enzima kao što je  $\alpha$ -amilaza može igrati ključnu ulogu u kontroli ovih bolesti. Neki inhibitori koji su trenutno u kliničkoj upotrebi su akarboza i miglitol. Međutim imaju svoja ograničenja, nespecifični su, možda neće smanjiti dijabetičke komplikacije, a dovode do nekoliko nuspojava. Biljni pripravci kao što su eterična ulja postaju sve važniji u tretmanu dijabetesa jer nemaju nuspojave i ekonomski su prihvatljiviji. Stoga danas sve više raste broj istraživanja koje se bave utjecajem eteričnih ulja na inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaze (4). Biljke s istaknutim pozitivnim utjecajem na zdravlje su one iz porodice Lamiaceae. Porodica Lamiaceae ili Labiatae (poznate kao obitelj metvice) je obitelj mirisnih biljaka koje se godinama koriste u tradicionalnoj medicini, a sadrže biološki aktivne spojeve sa snažnim inhibicijskim djelovanjem na  $\alpha$ -amilazu. Stoga korištenje ovih biljnih vrsta, ali i korištenje njihovih eteričnih ulja može pomoći u smanjenju razine šećera u krvi (5).

## 1.1 $\alpha$ -Amilaza

$\alpha$ -Amilaze su enzimi klasifikacijske oznake EC 3.2.1.1, pripadaju obitelji 13 skupine enzima glikozid-hidrolaze (GH-13). Za održavanje enzimske aktivnosti i stabilnosti konformacije zahtijevaju ione kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ), stoga se ubrajaju u kalcijeve metaloenzime. Unutar molekulske strukture može se pronaći jedan do deset čvrsto vezanih atoma kalcija. (Slika 1.) (6).



Slika 1. Trodimenzionalni prikaz strukture  $\alpha$ -amilaze s kalcijevim ionom u aktivnom centru (9)

Postoje dvije vrste hidrolaza: endohidrolaza i egzohidrolaza. Endohidrolaze djeluju na unutrašnjost molekule supstrata, dok egzohidrolaze djeluju na terminalne ne reducirajuće krajeve (7). Prema načinu djelovanja  $\alpha$ -amilaza spada u endo-enzime koji slučajnim odabirom napadaju unutarnje  $\alpha$ -(1-4)glikozidne veze u škrobu, sve osim onih u blizini točke grananja ili onih na kraju supstrata. Konačni produkti su  $\alpha$ -ograničeni dekstrini, razgranati saharidi koji se više ne mogu hidrolizirati i malto-oligosaharidi različitog stupnja polimerizacije (8).

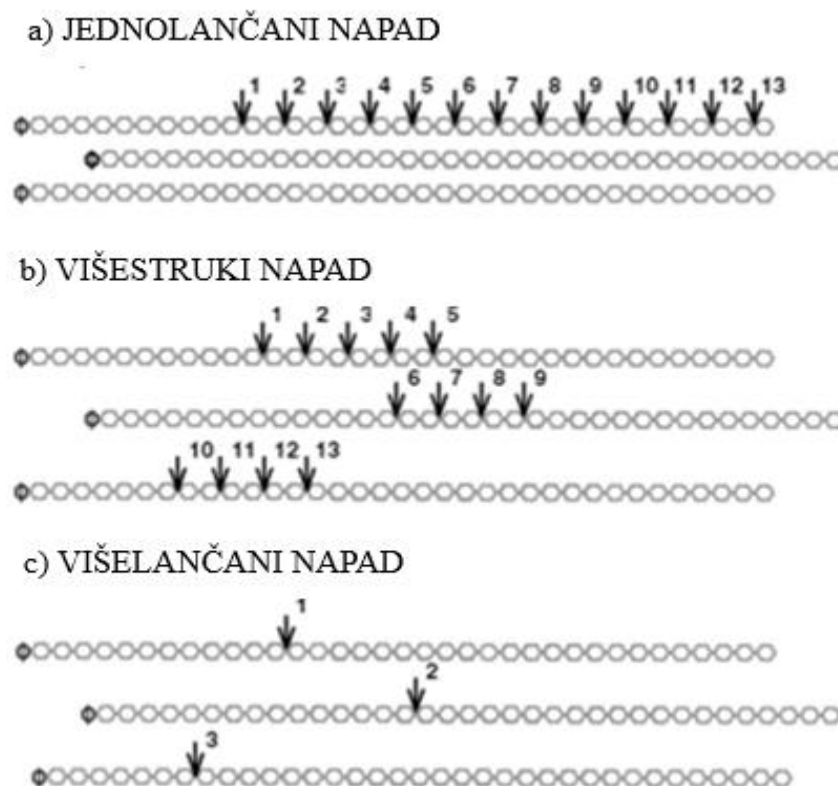
U ljudskoj fiziologiji  $\alpha$ -amilaze jedni su od glavnih sekretornih proizvoda gušterače i žlijezde slinovnice, a u prirodi se mogu naći i u mikroorganizmima, biljkama te višim organizmima (7).

### 1.1.1 Mehanizam djelovanja $\alpha$ -amilaze

$\alpha$ -Amilaze su endodjelujuće amilaze koje interno hidroliziraju  $\alpha$ -(1-4)glikozidne veze škrobnih polimera. Predloženo je nekoliko obrazaca djelovanja amilaze, kao što su nasumično djelovanje (engl. *random action*) i djelovanje višestrukog napada (engl. *multiple attack action*). (Slika 2.)

Nasumično djelovanje odnosi se na jedno-lančani napad (engl. *single-chain attack*) ili na više-lančani napad (engl. *multi-chain attack*). U prvom slučaju, molekula polimera se uzastopno u potpunosti hidrolizira (Slika 2a) prije disocijacije enzim-supstrat kompleksa. Kod drugog slučaja, ako dođe do učinkovita susreta, hidrolizira samo jedna veza (Slika 2c).

Višestruki napad (engl. *multiple attack*) je mješavina između jedno-lančanih i više-lančanih napada gdje enzim uzastopno cijepa nekoliko glikozidnih veza nakon prvog (slučajnog) hidrolitičkog napada prije nego što se odvoji od supstrata (Slika 2b). Smjer djelovanja višestrukog napada je prema ne reducirajućem kraju supstrata (10), a njegovo djelovanje je opće prihvaćen koncept koji objašnjava razlike u djelovanju amilaza (11).



Slika 2. Shematski prikaz djelovanja amilaze na amilozu i amilozne fragmente,  $\emptyset$  označava reducirajući kraj lanca; a strelice pokazuju položaj napada amilaze (11)



### 1.1.2 Metabolički poremećaji

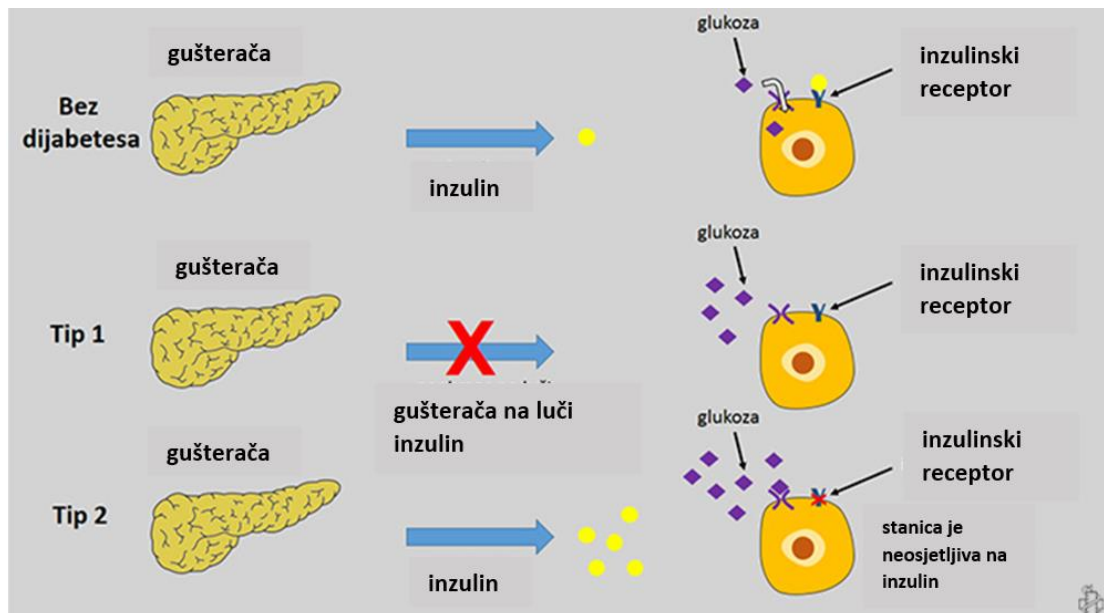
Poremećaji unosa ugljikohidrata mogu uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme kao što su dijabetes, pretilost i oralne bolesti.

*Diabetes mellitus* (DM, dijabetes) je metabolički poremećaj koji nastaje zbog ne dovoljnog lučenja inzulina, djelovanja inzulina, ili oboje, potičući poremećaje u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. Dugotrajne komplikacije dijabetesa uključuju retinopatiju, nefropatiju, neuropatiju, mikro-angiopatiju i povećani rizik od kardiovaskularnih bolesti. Postoje dvije temeljne vrste; dijabetes tip I kada gušterača ne proizvodi inzulin i dijabetes tip II kada gušterača ne proizvodi inzulin u dovoljnoj količini ili je učinak proizvedenog inzulina smanjen (Slika 3.). Terapijske strategije za liječenje dijabetesa tipa II uključuju smanjenje potrebe za inzulinom, stimulacijom endogenih lučenja inzulina, pojačanjem djelovanja inzulina na ciljna tkiva i inhibicijom razgradnje oligo- i di-saharida. Jedan od terapijski pristupa liječenju dijabetesa tipa II je smanjenje razine glukoze nakon obroka. To se može postići usporavanjem apsorpcije glukoze inhibicijom enzima koji hidroliziraju škrob i druge polisaharide,  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze. Enzimi  $\alpha$ -amilaze u ustima i crijevima hidroliziraju  $\alpha$ -(1,4)-glikozidnu vezu te cijepaju polisaharide na kraće oligosaharide. Budući takvi šećeri ne mogu biti apsorbirani u probavnom sustavu, oni se nadalje hidroliziraju do jednostavnijih oligosaharida ili monosaharida uz pomoć enzima  $\alpha$ -glukozidaza koji cijepaju  $\alpha$ -(1,4)- i  $\alpha$ -(1,6)glikozidnu vezu. Inhibitori ovih enzima, npr. akarboze, odgađaju probavu ugljikohidrata i produljuju ukupno vrijeme probave ugljikohidrata, uzrokujući smanjenje stupnja apsorpcije glukoze i posljedično prigušujući porast glukoze u plazmi nakon obroka (12). Nedavna istraživanja ističu dijabetes kao jedan od čimbenika rizika za razvoj Alzheimerove bolesti i drugih vrsta demencije. Učestalost bolesnika s dijabetesom tipa II i povećanom razinom i aktivnošću  $\alpha$ -amilaze veća je upravo kod bolesnika s demencijom (9).

Zubni karijes i parodontalne bolesti najčešće su oralne zarazne bolesti koje značajno utječu na cjelokupno zdravlje osobe.  $\alpha$ -Amilaza sline ima najmanje tri različite biološke funkcije u usnoj šupljini. Prvo, njezina hidrolitička aktivnost odgovorna je za početnu razgradnju škroba do oligosaharida. Drugo, nekoliko dokaza ukazuje da  $\alpha$ -amilaza u slini vezana za zubnu caklinu ili hidroksiapatit može igrati ulogu u stvaranju zubnog

plaka. Treće,  $\alpha$ -amilaza u otopini se s visokim afinitetom veže na oralne *Streptococcus viridans*, a tako vezana na bakterije sposobna je hidrolizirati škrob u glukozu, koja se može koristiti kao izvor hrane, a zatim dalje metabolizirati u mliječnu kiselinu.

Lokalizirana proizvodnja kiseline od strane bakterija može dovesti do otapanja zubne cakline, kritičnog koraka u napredovanju zubnog karijesa. Zbog svoje središnje uloge u usnoj šupljini,  $\alpha$ -amilaza sline iskorištena je kao sredstvo za strukturno potpomognut dizajn spojeva koji bi mogli spriječiti ne-željeno stvaranje zubnog plaka i kasnije proces stvaranja zubnog karijesa i njegovo napredovanje.



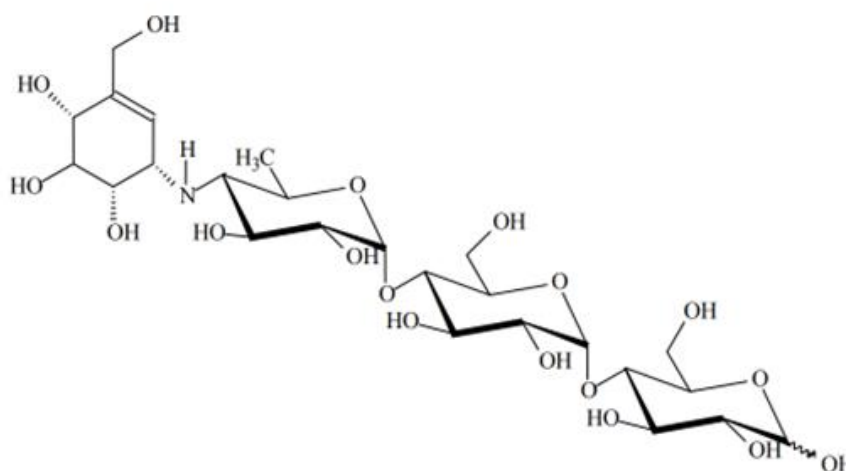
Slika 3. Prikaz vrsta dijabetesa, tip I i tip II (13)

### 1.1.3 Biljni inhibitori $\alpha$ -amilaza

Biljke su važan izvor kemijskih sastojaka s potencijalom inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze i mogu se koristiti kao terapeutici ili kao izvori funkcionalne hrane. Inhibicijski potencijal ljekovitog bilja pregledalo je nekoliko autora te su zabilježene razne biljke koje ga pokazuju i stoga mogu biti korištene za liječenje dijabetesa tipa II. Neke od biljnih komponenata kod kojih je zabilježeno bioaktivno djelovanje protiv hiperglikemije su alkaloidi, glikozidi, galaktomananska guma, polisaharidi, hipoglikani, peptidoglikani, gvanidin, steroidi, glikopeptidi i terpenoidi. Među biljnim sastavnicama koji su istraženi, flavonoidi su jedni od njih koji su pokazali najveću inhibicijsku aktivnost (12).

#### 1.1.3.1 Spojevi iz biljaka s inhibitornim djelovanjem na $\alpha$ -amilazu

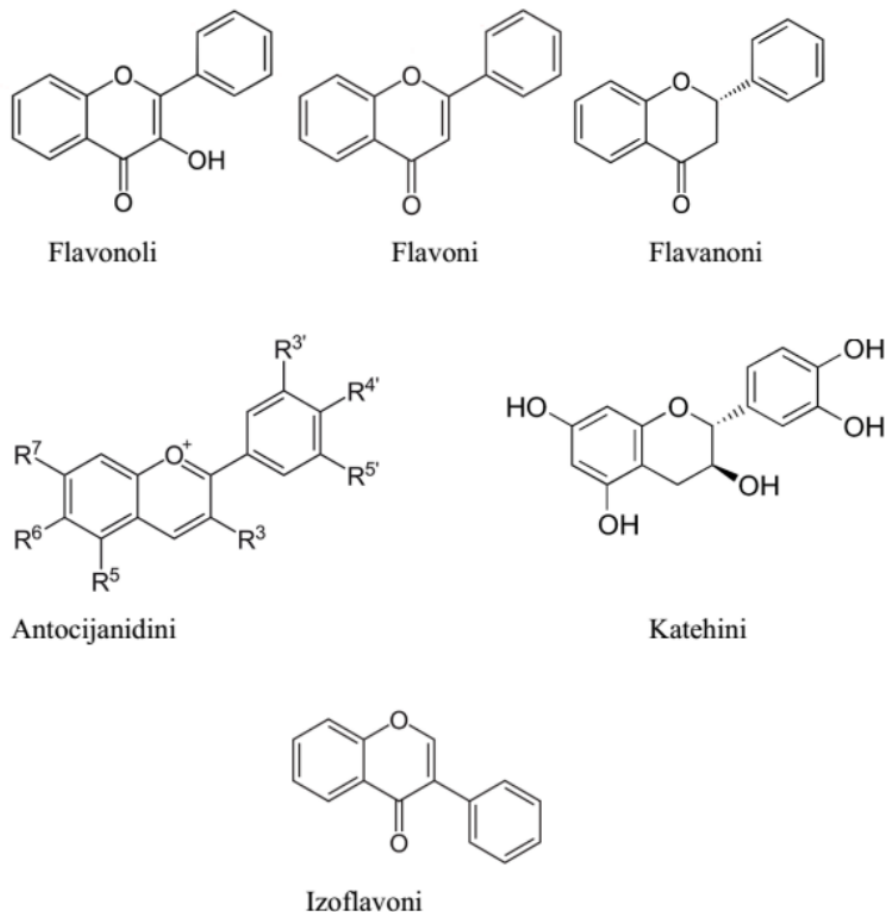
*Oligosaharidni inhibitori* iz obitelji trestatina koji sadrže akarviozinski dio (npr. akarboza), su inhibitori izolirani iz mikroba i biljnih tkiva, a molekule prisutne u biljkama sadrže prirodne inhibitore  $\alpha$ -amilaze. Akarboza, dobro poznati lijek koji se široko koristi u kliničkom liječenju dijabetesa, je pseudotetrasaharid. Kompetitivni je inhibitor  $\alpha$ -amilaze, mehanizam inhibicije je posljedica nezasićenog cikloheksenskog prstena i glikozidne dušične veze koja oponaša prijelazno stanje za enzimsko cijepanje glikozidnih veza. Akarboza se metabolizira pomoću ugljikohidrata u tankom i debelom crijevu dajući akarviozin-glukozu i glukozu (12).



Slika 4. Molekularna struktura akarboze (12)

*Fenolni spojevi* su velika skupina strukturno raznolikih prirodnih spojeva koji posjeduju barem jedan fenolni prsten u svojoj strukturi. Većina ovih spojeva posjeduje različite stupnjeve antioksidativnog djelovanja ili svojstva uklanjanja slobodnih radikala, kao i ljekovita svojstva te se dugo koriste kao lijekovi.

*Flavonoidi* su bogata klasa prirodnih fenolnih spojeva s nekoliko bioloških aktivnosti. Oni dijele zajedničku strukturu, skelet koji se sastoji od dva aromatična prstena (A i B) povezana preko tri atoma ugljika spojena na prsten A, tvoreći oksigenirani heterociklički prsten (prsten C). Lo Piparo i sur. (2008.) su istraživali interakcije između flavonoida i ljudske  $\alpha$ -amilaze kako bi se razumjeli molekularni zahtjevi za inhibiciju enzima. Pokazali su da je moć inhibicije povezana s broj hidroksilnih skupina na B prstenu skeleta flavonoida (14).



Slika 5. Osnovne podgrupe flavonoida (12)

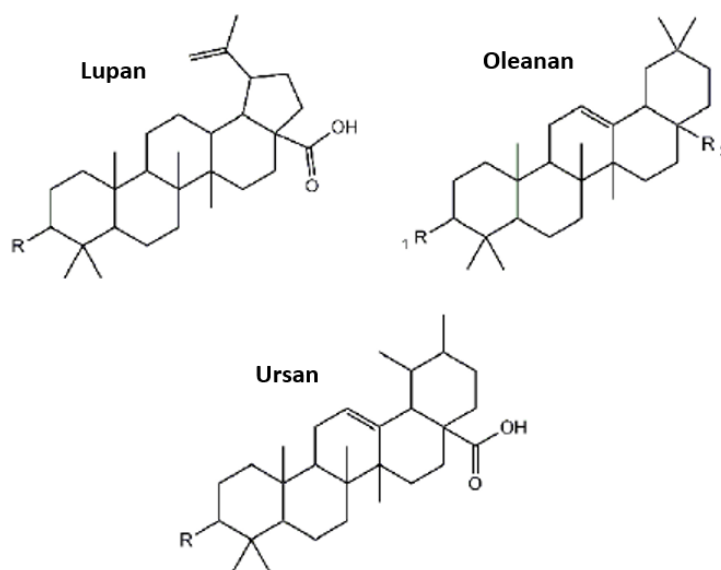
*Tanini* su još jedna heterogena skupina polifenola, široko rasprostranjena u biljnom carstvu, često su prisutni u nezrelim plodovima, ali mogu nestati tijekom zrenja. Imaju relativno visoku molekularnu masu, a dijele se u dvije velike klase: tanine koji se hidroliziraju i kondenzirane tanine (Slika 6.). Tanini koji se mogu hidrolizirati dijele se na galotanine, izvedene iz jedinica galne kiseline, povezanih sa šećernim ostatkom, dok su kondenzirani tanini složeni polimeri, kojima su građevni blokovi obično katehini i flavonoidi. Kod studija bolesnika s dijabetesom neovisnim o inzulinu, pokazalo se da taninska kiselina i bezalkoholne komponente crnog vina bogate taninom smanjuju razinu glukoze u serumu, nakon što je bolesnik konzumirao obrok bogat škrobom. Mehanizam uključen u ovaj anti-hiperglikemijski učinak je nepoznat. Mogući mehanizam izazivanja inhibicije  $\alpha$ -amilaze je upravo sposobnost snažnog vezanja za proteine tvoreći netopljivi i neprobavljivi kompleks koji je temelj njihove široke primjene u industriji kože, te za liječenje proljeva, krvarenja i ozljeda kože (15).

Klasa/polimer	Hidrolizirani tanini	Kondenzirani tanini
Osnovna jedinica	 <p data-bbox="758 1317 941 1346"><b>Galna kiselina</b></p>	 <p data-bbox="1173 1317 1268 1346"><b>Flavon</b></p>

Slika 6. Klase tanina (16)

*Terpeni* su spojevi različitih struktura koje u prirodi obavljaju nekoliko funkcija unutar biljnih i životinjskih organizama (detaljnije objašnjeni u odlomcima 1.2.1.1 i 1.2.1.2). Istaknuta skupina su triterpeni koji predstavljaju obećavajući i rastući izvor biološki aktivnih prirodnih spojeva s potencijalom za istraživanje i razvoj novih tvari s farmakološkim djelovanjem.

Triterpeni su velika i strukturno raznolika skupina prirodnih spojeva dobivenih od skvalena s nekoliko potencijalnih primjena u medicini. Prepisuje im se protuupalno, analgetsko, antifungalno, antimikrobno, antivirusno, antiplazmodijalno, anti-pretilno, antikancerogeno, hepato i kardioprotektivno djelovanje. Neki od triterpena s dobro okarakteriziranom biološkim aktivnostima uključuju sterole, steroide i saponine. Međutim, unatoč činjenici da su triterpeni široko rasprostranjeni u biljkama, inhibitorna aktivnost  $\alpha$ -amilaze odnosi se samo na vrste oleanana, ursana i lupana (Slika 7.), a mehanizam po kojem se ova aktivnost javlja još uvijek nije poznat (12).



Slika 7. Molekularne strukture triterpena lupanskog, ursanskog i oleananskog tipa (12)

## 1.2 Eterično ulje

Pojam eterično ulje potječe iz 16. stoljeća, od lijeka *Quinta essentia*, kojeg je imenovao Paracelsus von Hohenheim iz Švicarske. Mnogi su autori pokušali definirati eterična ulja. Francuska agencija za normalizaciju: *Agence Francaise de Normalization* (AFNOR) daje sljedeću definiciju (NF T 75-006): „Eterično ulje je proizvod dobiven od biljne sirovine, bilo destilacijom s parom ili mehaničkim postupkom iz epikarpa citrusa odnosno "suhom" destilacijom. Eterična ulja se zatim fizičkim sredstvima odvajaju od vodene faze.

Ova definicija uključuje proizvode koji se uvijek dobivaju iz biljnih sirovina, ali i proizvode koji se dobivaju drugim metodama ekstrakcije, kao što su korištenje nevodene otapala ili hladne apsorpcije (18). Odabir metode ekstrakcije ovisit će o karakteristikama materijala iz kojeg će se ekstrahirati ulje, budući da se mogu nalaziti u različitim dijelovima biljke, kao što su korijenje, stabljika, lišće, plodovi i/ili sjemenke.

Eterična ulja potječu iz sekundarnog metabolizma biljaka te predstavljaju kompleksne mješavine jedinstvenih kemijskih spojeva koji su zaslužni za karakterističnu aromu raznolikog bilja. Nakupljaju se u stanicama, izlučevinama ili žljezdanim dlačicama biljaka (19). Ova hlapiva ulja su općenito tekuća i bezbojna na sobnoj temperaturi. Topljiva su u alkoholima, eterima i fiksnim uljima (engl. *fixed oils*), ali netopljiva u vodi. Gustoća im je manja od jedan, uz nekoliko izuzetaka (cimet, sasafra i vetiver), imaju indeks loma i vrlo visoku optičku aktivnost (18).

Eterična ulja se zbog svog ugodnog mirisa koriste u različitim industrijama. Kozmetička industrija u velikoj mjeri koristi za pripremu parfema i losiona, u prehrambenoj industriji mogu poslužiti kao arome, ali i konzervansi, u farmaceutskoj industriji se zbog terapijskog djelovanja koriste kao dodatci raznim preparatima (21).

### 1.2.1 Kemijski sastav eteričnih ulja

Eterična ulja su prirodne, uljaste smjese intenzivnog mirisa. Mogu sadržavati preko 300 različitih organskih hlapivih spojeva, niske molekularne mase. Njihov tlak para pri atmosferskom tlaku i na sobnoj temperaturi je dovoljno visok da se dijelom nalaze u hlapivom stanju (21).

Ovi hlapivi spojevi pripadaju različitim kemijskim klasama: alkoholi, eteri ili oksidi, aldehidi, ketoni, esteri, amini, amidi, fenoli, heterocikli i uglavnom terpeni. Alkoholni, aldehidni i ketonski terpeni posjeduju brojne aromatične note, poput voćnih ((*E*)-nerolidol), cvjetnih (linalool), citrusa (limonen), biljnih ( $\gamma$ -selinen) itd. Nadalje, komponente eteričnog ulja uglavnom pripadaju velikoj obitelji terpena. U eteričnim uljima je identificirano više tisuća spojeva koji pripadaju obitelji terpena, kao što su funkcionalizirani derivati alkohola (geraniol,  $\alpha$ -bisabolol), ketoni (menton, *p*-vetivon), aldehidi (citronelal, sinensal), esteri ( $\gamma$ -tepinil acetat, cedril acetat) i fenoli (timol), ali također sadrže i neke neterpenske spojeve biogenerirane putem fenilpropanoida, kao što su eugenol, cinamaldehyd i safrol. Općenito s obzirom na građu C kostura komponente eteričnog ulja svrstavaju se u tri skupine: terpeni, fenilpropanski derivati i ostali spojevi (18).

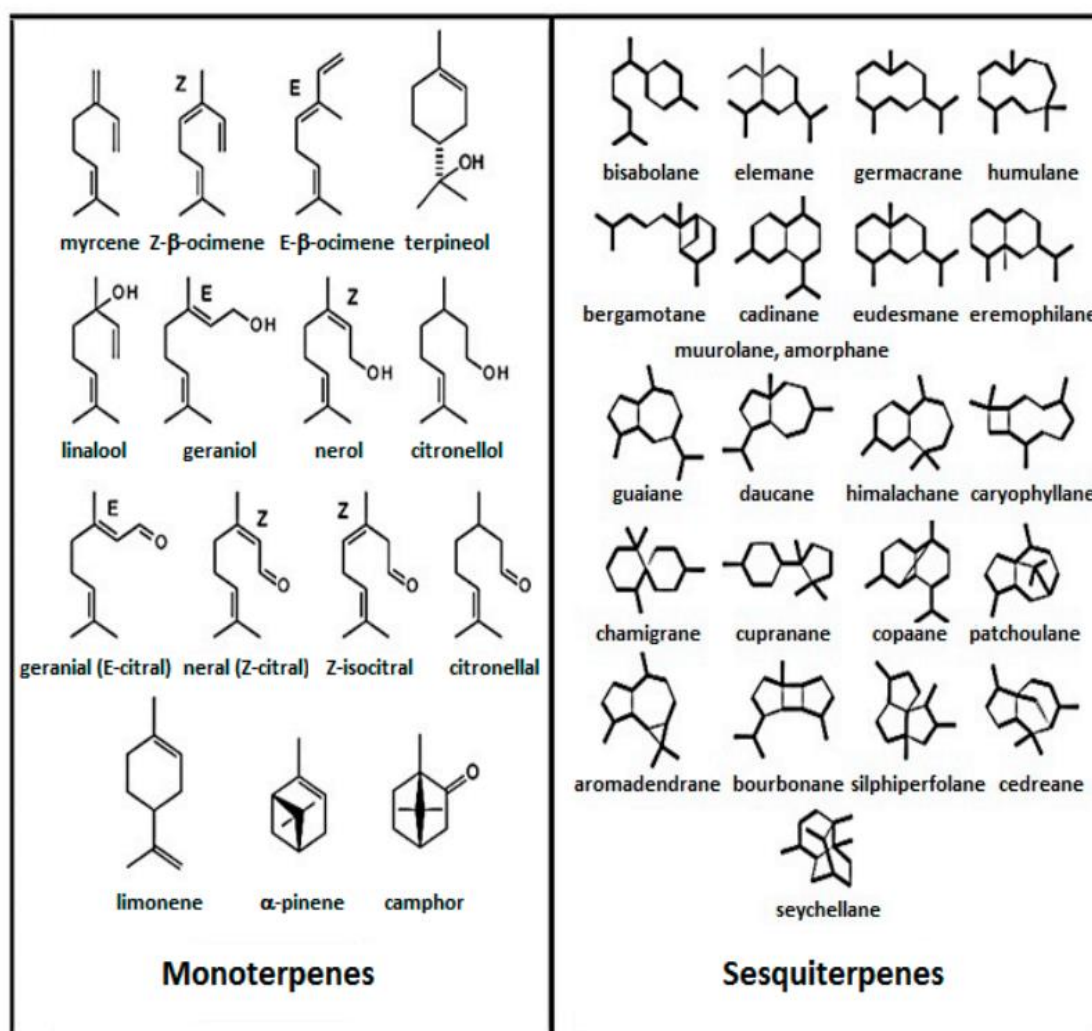
#### 1.2.1.1 Terpeni

Terpeni su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici ugodna mirisa, odgovorni su za aromu i miris svih biljaka. Ubrajaju se u tzv. jednostavne lipide, a sastoje se od izoprenskih jedinica. Dijele se na temelju broja C atoma na: hemiterpene (C<sub>5</sub>), monoterpene (C<sub>10</sub>), seskviterpene (C<sub>15</sub>), diterpene (C<sub>20</sub>), sesterpene (C<sub>25</sub>), triterpene (C<sub>30</sub>), tetraterpene (C<sub>40</sub>) i politerpene (>C 40) (Slika 7.) Većina eteričnih ulja se uglavnom sastoji od monoterpena i seskviterpena (Slika 8.) čiji je glavni metabolički put kroz mevalonat koji dovodi do seskviterpena i iz metil-eritritola koji vodi do monoterpena (18).



Terpeni	Broj izoprenskih jedinica	Broj C atoma
Izopren	1	5
Monoterpeni	2	10
Seskviterpeni	3	15
Diterpeni	4	20
Sestertrepeni	5	25
Triterpeni	6	30
Tetraterpeni	8	40
Politerpeni	>8	>40

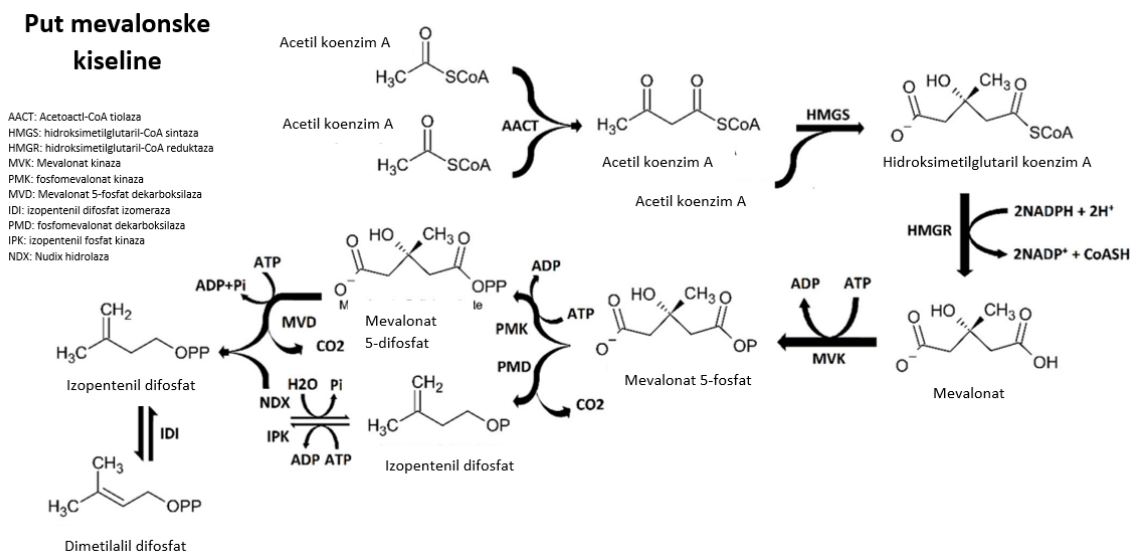
Slika 8. Podjela terpena (17)



Slika 9. Molekularne strukture monoterpena i seskviterpena (22)

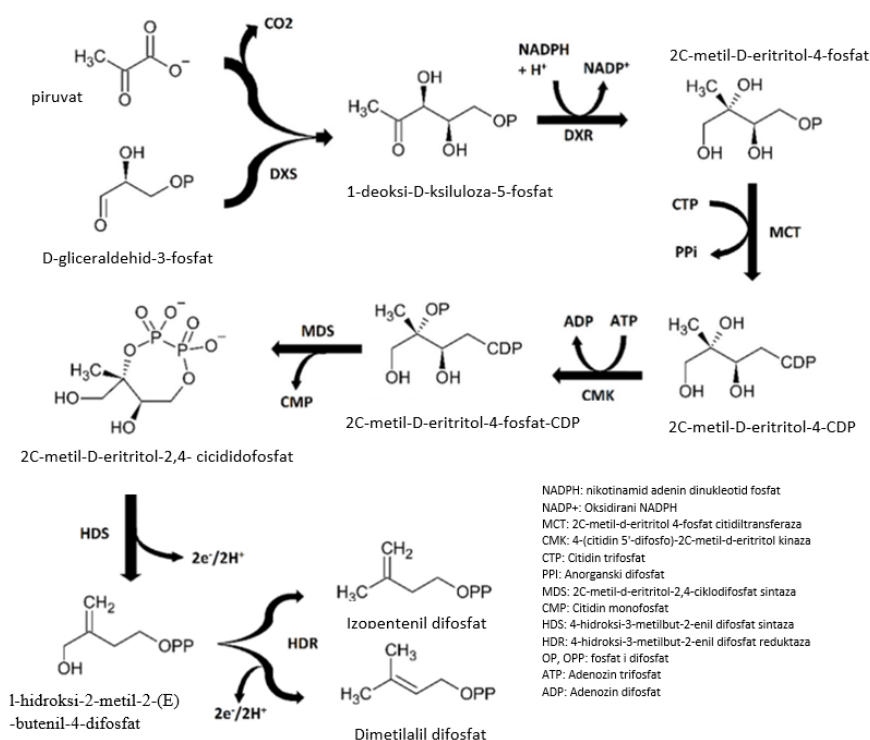
### 1.2.1.2 Biosinteza terpena

Prekursore izoprena, izopentenila i dimetilalil difosfata proizvode dva različita biokemijska puta, a to su putevi mevalonske kiseline (MVA put) i 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfata (MEP put). MVA put je aktivan u svim eukariotima, ali MEP put je ograničen na određene organizme, uključujući alge i više biljke. U višim biljkama, MVA i MEP putovi se javljaju u različitim odjeljcima fotosintetskog tkiva. MVA put je aktivan u citosolu, dok je MEP put aktivan u plastidima. Konačno, MVA put proizvodi seskviterpene, sterole i triterpene, dok MEP put proizvodi monoterpene, diterpene i tetraterpene (22).



Slika 10. Biosintetski koraci puta mevalonske kiseline prema sintezi terpena (22)

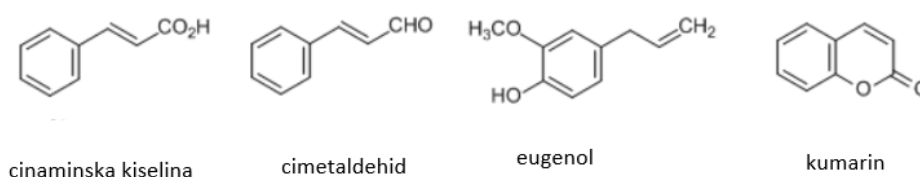
## Put 2C-metil-D-eritritol-4-fosfata



Slika 11. Biosintetski koraci puta MEP (22)

### 1.2.1.3 Fenilpropanoidi

Fenilpropanoidi su prirodni organski spojevi koji sadrže fenilni prsten s jednim bočnim propanskim lancem. Hlapivi su te se obično izrađuju od istog prekursora fenilalanina ili tirozina i ne karakteriziraju ih osnovne 'jedinice' kao u terpena. Fenilpropanoidi su aromatični spojevi u kemijskom smislu (delokalizirani elektroni, benzenski dio) koji nisu klasificirani prema veličini, već prema karakteru oksidacije (vezivanje relativno elektronegativnih atoma), što uključuje alkohole, fenole, aldehide, metoksi- i metilendioksi varijante (22).



Slika 12. Prikaz nekih fenilpropanoida (22)

#### **1.2.1.4 Biosinteza fenilpropanoida**

Put šikimata (put šikimatske kiseline) odgovoran je za biosintezu svih fenilpropanoida. Pretežno je aktivan u plastidima, odakle potječe nekoliko primarnih enzima. Put šikimata proizvodi mnoge klase spojeva, kao što su fenoli, floroglucinoli, lignin, flavonoidi, aminokiseline i druge (22).

### 1.3 Obitelj Lamiaceae

Lamiaceae (usnače, ranije nazivane Labiatae), najbrojnija su obitelj biljaka iz reda Lamiales. Rastu diljem svijeta, s velikom raznolikošću, posebice u Kaliforniji, Meksiku i Mediteranskom području. Iako žive u raznim staništima mnoge su prilagođene suši (23). Rastu u raznim oblicima, ali najčešće ih se pronalazi kao zeljaste i grmolike biljke, vrste koje se obitavaju u suptropskim i tropskih krajevima rastu kao grmlje. Obitelj se sastoji od oko 236 rodova i više od 6000 vrsta, a najveći su rodovi *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Plectranthus*, *Hyptis*, *Teucrium*, *Vitex*, *Thymus* i *Nepeta*. (24) Taksonomija ove biljne porodice je prikazana Tablicom 1.

Tablica 1. Taksonomija porodice Lamiaceae (25)

Carstvo	<i>Plantae</i>
Divizija	<i>Tracheophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Lamiales</i>
Porodica	<i>Lamiaceae</i>

Ovo je jedna od rijetkih porodica koje se mogu prepoznati na temelju vegetativnih obilježja. Imaju četvrtaste stabljike na novom izrastu, mirisne listove, a položaj listova je nasuprotan, upravo kombinacija ovih osobina ih identificira. Mogu se prepoznati i po značajkama cvijeta. Cvjetovi su često u kovrčavim klasovima, nepravilni su, dvousni s 5 spojenih čašica i 5 spojenih latica, 2 ili 4 prašnika, a gornji jajnik je podijeljen u 4 režnja. Ova posljednja osobina jajnika i činjenica da sazrijeva u 4 orašasta ploda s jednom sjemenom, najdosljednija je karakteristika u cijeloj obitelji, a uobičajena metoda razlikovanja je prema kombinaciji mirisnih listova i četvero-segmentnog jajnika. (23)

Većina vrsta koje pripadaju ovoj obitelji su aromatične i posjeduju eterična ulja (26). Za njihovu aromatičnost zaslužni su polifenolni spojevi (Tablica 2.) kojima pripadnici ove vrste obiluju. Aromatična eterična ulja najprisutnija su listovima, no mogu se naći u svim nadzemnim dijelovima biljaka. Dragocjena su u prehrambenoj, kozmetičkoj, aromatičnoj, mirisnoj, parfumerijskoj, pesticidnoj i farmaceutskoj industriji.

Tablica 2. Polifenoli prisutni u biljkama obitelji Lamiaceae (27).

Polifenoli	Ružmarinska kiselina
	Protokatehinska kiselina
	<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina
	Gentinska kiselina
	Klorogenska kiselina
	Siringinska kiselina
	Kafeinska kiselina
	Vanilinska kiselina
	Ferulinska kiselina
	<i>p</i> -kumarinska kiselina

### 1.3.1 Terapijski učinci

Lamiaceae je važna obitelj ljekovitih biljaka s bogatom tradicijom upotrebe u terapijske svrhe. Svaka vrsta ima posebnu i složenu mješavinu bioaktivnih spojeva kod kojih svaka komponenta doprinosi ukupnoj bioaktivnosti. Terapijska primjena ljekovitog bilja pripisuje se prisutnosti širokog spektra sekundarnih metabolita ili fitokemikalija kao što su alkaloidi, saponini, flavonoidi, glikozidi i fenoli s različitim farmakološkim aktivnostima. Dokazano im je snažno antibakterijsko, antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, antivirusno i antikancerogeno djelovanje (24).

Neke od vrsta Lamiaceae koriste se kao kulinarsko bilje i uzgajaju se za konzumaciju, osim iznimne arome koju pružaju zbog visokog udjela polifenola imaju i važnu ulogu u ljudskom zdravlju jer polifenoli djeluju kao antioksidansi. Primjer su bosiljak (*Ocimum* spp.), metvica (*Mentha × piperita* L.), ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), kadulja (*Salvia officinalis* L.) (Slika 9.), čubar (*Satureja hortensis* L.), mažuran (*Origanum majorana* L.), origano (*Origanum vulgare* L.), timijan (*Thymus vulgaris* L.) i lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.) (28).



Slika 13. Kadulja (29)

Alzheimerova bolest, najčešći je uzrok demencije, posljedica je oksidativnog oštećenja živčanih stanica, a liječi se inhibicijom kolinesteraze, a upravo su ekstrakti biljaka ove obitelji pokazali visoku stopu inhibicije.

Biljni polifenoli smatraju se prirodnim inhibitorima enzima  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze. Biljna porodica Lamiaceae zbog svog bogatog polifenolnog sastava istraživana je i u svrhu određivanja inhibicijskog djelovanja, a zaključeno je kako bi se mogle koristiti u upravljanju glikemijskog odgovora kod ljudi oboljelih od dijabetesa tipa II. Osim toga, dijabetes tipa II povezan je s rizikom od kardiovaskularnih bolesti. Zaštitni učinak polifenola na kardiovaskularne bolesti ogleda se i u antitrombocitnom učinku flavonoida koji mogu spriječiti stvaranje trombocitnih ugrušaka (30).

Biljke porodice Lamiaceae posjeduju i antimikrobna svojstva. Polifenoli su efikasniji u suzbijanju Gram-pozitivnih nego Gram-negativnih bakterija to se pripisuje razlici u građi membrana tih bakterija i činjenici da se antimikrobna svojstva polifenola očituju narušavanjem membranske strukture bakterije (31).

## **CILJ ISTRAŽIVANJA**



Cilj ovog istraživanja je pregled relevantne znanstvene literature do danas provedenih istraživanja na temu eteričnih ulja biljaka porodice Lamiaceae koji djeluju kao inhibitori enzima  $\alpha$ -amilaze. S navedenim ciljem pregledane su relevantne znanstvene baze podataka koje sakupljaju sve znanstvene radove na ovu temu (*Web of Science Core Collection* i *Scopus* ). Kod pregleda literature obraćena je pozornost na način izolacije eteričnih ulja iz biljka, način identifikacije izoliranih ulja, metoda kojom je testirana sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze, što je uzeto kao referentna komponenta i način prezentacije dobivenih rezultata.



Prilikom izrade rada koristila se metoda kontinuiranog pregleda literature. Kao izvori podataka koristile su se dostupne knjige i znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*. Pri pretraživanju stručnih i znanstvenih članaka korištene su sljedeće ključne riječi:  *$\alpha$ -amylase*, *inhibitory activity*, *essential oils*, *Lamiaceae*, *Diabetes mellitus*.

The screenshot shows the Web of Science interface. At the top, there is a navigation bar with 'Clarivate', 'English', and 'Products'. Below that, the 'Web of Science' logo is followed by 'Search', 'Marked List', 'History', and 'Alerts'. On the right, there are 'Sign In' and 'Register' buttons. The main content area displays search results for 'Essential oils, Chemical composition (Topic)'. It shows '291 results from Web of Science Core Collection for:'. Below the search bar, there are buttons for 'Analyze Results', 'Citation Report', and 'Create Alert'. The results are refined by 'Document Types: Review Articles' and 'Web of Science Categories: Food Science Technology'. A 'Refine results' sidebar on the left includes a search box and 'Quick Filters' for 'Review Articles' (291), 'Early Access' (19), and 'Open Access' (79). The main results list shows one result: 'Essential oil of Nepeta genus (Lamiaceae) from Iran: a review' by Asgaraanah, J., Sarabian, S. and Ziarati, P., published in 'JOURNAL OF ESSENTIAL OIL RESEARCH' 26 (1), pp.1-12, Jan 2 2014. This result has 19 citations and 55 references. The interface also includes options to 'Add To Marked List' and 'Export', and a 'Sort by: Relevance' dropdown.

Slika 14. Baza podataka *Web of Science*

## **2. MATERIЈAL I METODE**

Uzorci eteričnih ulja na kojima su se provodila ispitivanja uglavnom su dobivena postupkom hidrodestilacije, dok se njihov kemijski sastav najčešće analizirao pomoću GC-FID (plinska kromatografija s plamenoionizacijskim detektorom) i GC-MS (plinska kromatografija sa spektrometrijom masa) vezanih sustava.

U istraživanjima inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze najčešće korištene metode su Caraway–Somogyi jod/kalij jodid metoda i DNSA metoda (Metoda 3,5-dinitrosalicilne kiseline), a spominje se još i CNPG3 (2-kloro-*p*-nitrofenil- $\alpha$ -*D*-maltotriozid) metoda.

## **2.1 Test inhibicije enzima $\alpha$ -amilaze Caraway–Somogyi jod / kalij jodid metodom**

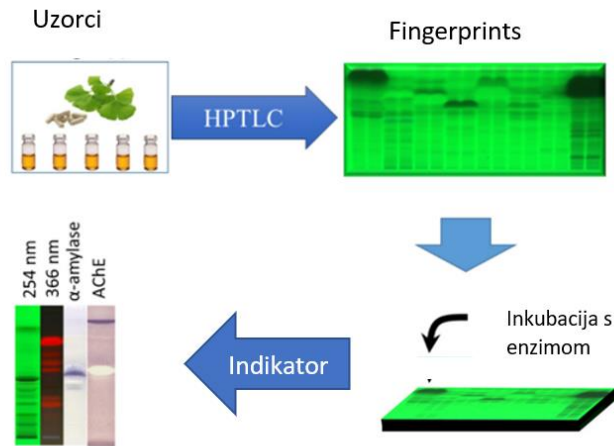
25  $\mu$ L otopine uzorka eteričnog ulja koncentracije 1 mg/mL pomiješa se s 50  $\mu$ L otopine  $\alpha$ -amilaze u fosfatnom puferu (pH 6,9 sa 6 mM natrijevog klorida) na mikrotitarskoj ploči s 96 jažica i inkubira 10 minuta na 37°C. Nakon predinkubacije, reakcija se započne dodatkom 50  $\mu$ L otopine škroba (0,05%). Slijepa proba se pripremi dodatkom otopine uzorka svim reakcijskim reagensima bez dodatka otopine enzima ( $\alpha$ -amilaze). Nakon pripreme reakcijska smjesa se inkubira 10 minuta na 37°C. Reakcija se zaustavlja dodatkom HCl (25  $\mu$ L, 1 M), zatim se dodaje 100  $\mu$ L otopine jod/kalij jodid (100  $\mu$ L). Apsorpcija uzorka ili slijepe probe detektira se na valnoj duljini od 630 nm. Apsorpcija slijepe probe oduzme se od apsorbancije uzorka te se rezultati iskažu kao EC<sub>50</sub> (32).

## **2.2 Test inhibicije enzima $\alpha$ -amilaze DNSA metodom**

Matična otopina hlapivog ulja od 1 mg/mL priprema se u 10 % DMSO (dimetil sulfoksid), a zatim otapa u natrij fosfatnom puferu (0,02 M) na pH 6,9. Radne otopine hlapivog ulja koncentracija 10, 50, 100, 500 i 1000  $\mu$ g/mL pripremaju se također koristeći natrij fosfatni pufer (pH 6,9). Akarboza se koristi kao standard, a osnovna i radna otopina akarboze pripremaju su na isti način kao i matična otopina hlapivog ulja. Otopina  $\alpha$ -amilaze priprema se otapanjem 12,5 mg enzima  $\alpha$ -amilaze u natrij fosfatnom puferu pri pH 6,9. Nakon priprema otopina, 200  $\mu$ L otopine  $\alpha$ -amilaze pomiješa s 200  $\mu$ L svake radne otopine hlapivog ulja i inkubira 10 minuta na 37°C. Zatim se doda 200

$\mu\text{L}$  otopine škroba i inkubira 3 min. Reakcija se zaustavlja dodatkom 200  $\mu\text{L}$  DNSA reagensa (3,5-dinitrosalicilna kiselina) i zatim kuha 10 minuta u vodenoj kupelji na 85-90°C. Smjesa se ohladi na sobnu temperaturu i razrijedi s 5 mL destilirane vode, izmjena apsorbancije mjeri se na 540 nm pomoću UV-Vis spektrofotometara. Slijepa proba sa 100% enzimskom aktivnošću pripremljena je zamjenom biljnog ekstrakta s 200  $\mu\text{L}$  pufera, a kao uzorak pozitivne kontrole koristi se akarboza. Inhibicijska aktivnost  $\alpha$ -amilaze izražena je kao postotak inhibicije, a izračunata je pomoću izraza  $(\text{Abs}_{\text{kontrola}} - \text{Abs}_{\text{test}} / \text{Abs}_{\text{kontrola}}) \times 100\%$ . Iz dobivenih rezultata, u koliko je to moguće, izračunava se  $\text{EC}_{50}$  (33).

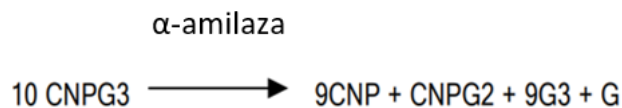
Ovo je metoda koja se može primijeniti kod razdvajanja sastavnica ulja tankoslojnom kromatografijom, TLC te visoko učinkovitom tankoslojnom kromatografijom (HPTLC) 1% (w/v) otopina  $\alpha$ -amilaze pripremi se razrjeđivanjem približno 1,25 mL (1 g) enzima  $\alpha$ -amilaze s destiliranom vodom do ukupnog volumena od 100 mL i pohranjena na 2-8 °C. 2% (w/v). Otopina škroba se priprema dodavanjem glatke paste topljivog škroba u kipuću vodu i miješanjem dok se sav škrob ne otopi. (34). Otopina joda se čuva u hladnjaku na 4°C, do analiza. Razvijene TLC ploče prvo se suše kako bi se uklonili svi tragovi mobilne faze, a zatim uranjaju u otopinu  $\alpha$ -amilaze. Ploče se potom inkubiraju na 37°C / 30 minuta, pa uranjaju u otopinu supstrata (2% (w/v) škroba) te inkubiraju još 10-20 minuta kako bi reakcija enzima i supstrata dosegla završetak. Ploče se potom uranjaju u otopinu joda. Uočene tamnoplave zone na bijeloj pozadini ukazuju na inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaze.  $\alpha$ -Amilaza je odgovorna za hidrolizu škroba u kraće polisaharide, odnosno dekstrine, maltozu i glukozu. Jod, s druge strane, tvori plavi do crni kompleks sa škrobom, ali ne reagira s glukozom. Stoga škrob koji nije bio hidroliziran  $\alpha$ -amilazom zbog inhibicije enzima spojevima prisutnim u eteričnim uljima, stvara tamnoplavu zonu na TLC ploči u prisutnosti joda. (Slika 11.) (34)



Slika 15. HPTLC tehnika kod metode inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze (34)

### 2.3 Test inhibicije enzima $\alpha$ -amilaze CNPG3 (2-kloro-*p*-nitrofenil- $\alpha$ -*D*-maltotriozid) metodom

1000  $\mu$ L reagensa R1 (sastava MES pufer 100 mmol/L, NaCl 350 mmol/L, Ca-acetat 6 mmol/l, kalijev tiocijanat 900 mmol/L, CNP-G3 2,27 mmol/L, sabilizator >0,1%) pomiješa se sa 3  $\mu$ L seruma, plazme ili urina. Izmjena apsorbancije mjeri se nakon 30 sekundi, a zatim opet nakon 1, 2 i 3 minute na 405 nm pomoću UV-Vis spektrofotometara (pri temperaturi od 37°C), a kao slijepa proba koristi se destilirana voda. Izračunaje se  $\Delta$ Abs/min (prosječno) preko formule  $\alpha$ -amilaza =  $\Delta$ Abs/min (prosječno) x Faktor (Faktor =koncentracija kalibratora/ $\Delta$ Abs/min (prosječno))(38)

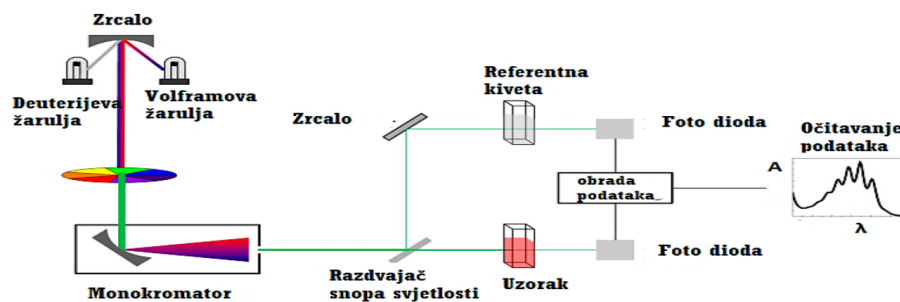


Slika 16. Reakcija na kojoj se temelji metoda, 2-kloro-*p*-nitrofenil- $\alpha$ -*D*-maltotriozid (CNPG3), 2-kloro-nitrofenol (CNP), 2-kloro-*p*-nitrofenil- $\alpha$ -*D*-maltozid (CNPG2), maltotrioza (G3) i glukoza (G).(38)

## 2.5 Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je najčešće korištena tehnika ispitivanja aktivnosti inhibitora kojom se mjeri intenzitet svjetlosti dok snop svjetlosti prolazi kroz otopinu uzorka. Zasniva se na apsorpciji svjetlosti. Tehnika se koristi za kvantitativno određivanje velikog broja tvari u otopini s toga ima važnu primjenu u mnogim područjima znanosti uključujući fiziku, kemiju, astronomiju i biokemiju. Ova tehnika je značajna upravo zbog svoje ekonomičnosti, točnosti i jednostavnosti. Ubraja se u spektroskopske tehnike te se na njoj temelje na sva promatrana istraživanja unutar ovoga rada. (35)

Uređaj pomoću kojeg se mjeri naziva se spektrofotometar. Spektrofotometar je instrument koji mjeri broj fotona (intenzitet svjetlosti) apsorbiranih nakon prolaska kroz otopinu uzorka. Ovisno o rasponu valne duljine izvora svjetlosti, može se klasificirati u dvije različite vrste; UV-vidljivi spektrofotometar koji koristi svjetlost u ultraljubičastom (185 - 400 nm) i vidljivom (400 - 700 nm) spektru elektromagnetskog zračenja te IR spektrofotometar koji koristi svjetlost infracrvenog (700 - 15000 nm) spektara elektromagnetskog zračenja. Spektrofotometar se sastoji od dva uređaja: spektrometar i fotometar. Spektrometar je uređaj koji proizvodi, raspršuje i mjeri svjetlost. fotometar označava fotoelektrični detektor koji mjeri intenzitet svjetlosti.(35)



Slika 17. Shema spektrofotometra (35)



### **3. REZULTATI I RASPRAVA**

Cilj ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaza eteričnim uljima i sastavnicama eteričnih ulja biljaka porodice Lamiaceae.  $\alpha$ -Amilaza je jedan od važnih enzima u procesu probave ugljikohidrata, a samim tim je važan u patogenezi dijabetesa. Od ove bolesti u suvremenom svijetu oboljeva veliki broj dio populacije. Obzirom da lijekovi koji se koriste u liječenju sadrže i stanovite nuspojave neprestalno se traže iz prirode izolirani inhibitori ovog enzima s ciljem moguće prevencije i/ili tretmana dijabetesa. Kao izvori podataka koristile su se dostupne relevantne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*. Pri pretraživanju stručnih i znanstvenih članaka korištene su sljedeće ključne riječi:  *$\alpha$ -amylase, inhibitory activity, essential oils, Lamiaceae, Diabetes mellitus*.

Ceylan i suradnici su 2015. god. (32) istražili kemijski sastav i sposobnost inhibicije eteričnog ulja biljke *Thymus spathulifolius*. Nadzemni dijelovi biljke (cvjetovi, listovi i mlade stabljike) sakupljeni su u Tuskoj tijekom srpnja 2014.god. u gradu Kemah, središte pokrajne Erzincan. Eterično ulje izolirano je hidrodestilacijom u Clevenger aparaturi i analizirano GC-FID i GC-MS veznim sustavima. Kao najzastupljenije komponente ulja identificirani su timol (50,5%), borneol (16,7%) i karvakrol (7,7%). Sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze testirana je Jod/kalij jodid metodom (IKI metoda) po Caraway–Somogy-u. Inhibicijski potencijal ovog ulja iznosio je  $EC_{50} = 7,19 \pm 0,14$  mg/mL. Istom studijom testiran je inhibicijski potencijal akarboze i iznosio je  $EC_{50} = 0,98 \pm 0,05$  mg/mL.

Tablica 3. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze uzorcima eterična ulja biljke *Thymus spathulifolius* (32)

Uzorak	$EC_{50}$ (EO)	$EC_{50}$ (akarboza)
EO <i>Thymus spathulifolius</i>	$7,19 \pm 0,14$ mg/mL	$0,98 \pm 0,05$ mg/mL

EO=eterično ulje;  $EC_{50}$ =inhibicija 50%

Aazza i suradnici su 2016. godine (35) radili *in vitro* istraživanje o antioksidativnom, protuupalnom te antihiperглиkemijskom djelovanju eteričnih ulja izoliranih iz šest vrsta biljaka obitelji Lamiaceae: *Thymbra capitata*, *T. albicans*, *T. caespitius*, *T. carnosus*, *T. lotocephalus* i *T. mastichina* (rod *Thymus* – timijan ili majčina dušica) s ciljem dobivanja uvida u procjenu biološke aktivnosti eteričnih ulja. Biljke su prikupljene u

Portugalu 2016. god. u fazi cvatnje, *T. capitata*, *T. albicans*, *T. lotocephalus* i *T. mastichina* prikupljene su u regiji Algarveu, *T. carnosus* je prikupljena u regiji Alenteju, a *T. caespititius* na Azorskom otočju. Cijele biljke su korištene kao biljni materijal iz kojih su hidrodestilacijom u Clevenger aparaturi izolirana eterična ulja, te su analizirana GC-MS veznim sustavom. Kapacitet inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze za ovaj rod procijenjen je po prvi puta upravo u ovom radu. Glavni identificirani sastojci su bili timol, borneol, karvakrol, 1,8-cineole i kamfen. Karvakrol je bio glavna komponenta eterična ulja *T. capitata*, timol i karvakrol prevladavali su u eteričnom ulju *T. caespititius*. 1,8-cineol je prevladavao u *T. albicans*, *T. mastichina* i *T. lotocephalus*, te kamfen i borneol u *T. carnosus*. Ispitivanje inhibicije  $\alpha$ -amilaze provedeno je Jod/kalij jodid metodom pri 620 nm. Inhibicijska aktivnost izračunata je preko formule  $[1 - (\text{Abs2} - \text{Abs1}) / (\text{Abs4} - \text{Abs3})] \times 100$ , gdje je Abs1 apsorbancija inkubirane otopine koja sadrži uzorak, škrob i  $\alpha$ -amilazu, Abs2 je apsorbancija inkubirane otopine koja sadrži uzorak i škrob, Abs3 je apsorbancija inkubirane otopine koji sadrži škrob i amilazu, a Abs4 je apsorbancija inkubirane otopina koja sadrži samo škrob. Rezultati su prikazani u Tablici 5. te izraženi u EC<sub>50</sub> vrijednosti. Vrijednosti pozitivne kontrole nisu date u radu.

Tablica 4. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljima biljaka porodice Lamiaceae (35)

Uzorak	EC <sub>50</sub> (EO)
EO <i>Thymbra capitata</i>	0,8±0,1 mg/mL
EO <i>Thymus albicans</i>	9,2±0,1 mg/mL
EO <i>Thymus caespititius</i>	1,1±0,1 mg/mL
EO <i>Thymus carnosus</i>	6,4±0,1 mg/mL
EO <i>Thymus lotocephalus</i>	na
EO <i>Thymus mastichina</i>	4,6±0,0 mg/mL

Rezultati su dati kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri različita testiranja.

na= nema aktivnosti

Eterična ulja *T. capitata* i *T. caespititius* pokazala su najbolju sposobnost za inhibiciju  $\alpha$ -amilaze. Takvi rezultati upućuju da karvakrol i/ili timol imaju veliku ulogu u inhibiciji tog enzima. Dok eterično ulje *T. lotocephalus* nije inhibiralo  $\alpha$ -amilazu, bilo je jedan od najaktivnijih kao inhibitor  $\alpha$ -glukozidaze, uz eterično ulje *T. caespititius*

Eterična ulja *T. albicans* i *T. mastichina* pokazala su najslabiju inhibicijsku aktivnost.(35)

Zengin i sur. (2016) (36) su istražili biološku aktivnost eteričnog ulja i njegovih terpenskih komponenti biljke *Sideritis galactica* (Lamiaceae). Cijele biljke prikupljene su iz Çubuka, Ankara u Turskoj 13. srpnja 2013. god. zatim je, na zraku osušen i samljeven, biljni materijal podvrgnut hidrodestilaciji u Clevenger aparaturi da bi se izoliralo eterično ulje. Analiza ulja provedena je GC-MS veznim sustavom, a utvrđena je visoka razina sljedećih terpena:  $\alpha$ -pinen (23%),  $\beta$ -pinen (32,2%),  $\beta$ -ocimen (9,5%),  $\beta$ -kariofilen (16,9%), germakren-D (1,2%) i kariofilen oksid (1,2%). Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze ispitana je metodom Caraway-Somogyj-a Jod/kalij jodid (IKI), dok je kao standardni inhibitor korištena akarboza. Rezultati su pokazali izraženu inhibitornu aktivnost eteričnog ulja na enzim  $\alpha$ -amilazu ( $EC_{50}=0,899$  mg/mL). Učinak je, međutim, bio manji od onog akarboze ( $EC_{50}=0,548$  mg/mL).

Tablica 5. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze uzorcima eterična ulja biljke *Sideritis galactica* (36)

Uzorak	$EC_{50}$ (EO)	$EC_{50}$ (akarboza)
EO <i>Sideritis galactica</i>	0,899 mg/mL	0,548 mg/mL

Godine 2017. Bahadori i sur. (37) istražili su sastav i aktivnost eteričnog ulja biljke porodice Lamiaceae, *Hymenocrater bitumenosus* Fisch. Nadzemni dijelovi biljke, uključujući cvijeće, lišće i mlade stabljike, prikupljeni su tijekom sezone cvatnje u rano proljeće iz Urmije, iranske pokrajine Zapadni Azerbajdžan, 2017.godine. Biljka se koristila u iranskoj narodnoj medicini za liječenje zdravstvenih problema kao što su glavobolja, groznica i iritacije kože. Eterično ulje dobiveno je hidrodestilacijom i analizirano je pomoću GC-MS vezanog sustava. U njemu je identificiran 51 hlapivi spoj koji predstavlja 94,1% ukupnog sastava ulja. Glavni identificirani sastojci su  $\alpha$ -pinen (18,2%),  $\beta$ -pinen (11,3%), *trans*-fitol (11,0%) i spatulenol (8,5%) (Slika 13.). Glavnu frakciju ulja predstavljaju monoterpeni ugljikovodici (32,3%), slijede oksidirani monoterpeni (13,5%), diterpeni (13,2%) i oksidirani seskviterpeni (13,0%). U najmanjem udjelu dolaze alkani (9,9%) i seskviterpeni ugljikovodici (6,8%). Metoda

testiranja koja se koristila za određivanje inhibicijske sposobnosti na enzim  $\alpha$ -amilazu je metoda Caraway-Somogyj-a Jod/kalij jodid (IKI), a rezultati su pokazali da eterično ulje ima sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze u vrijednosti  $0,91 \pm 0,09$  mmol ACE/g uzorka (izraženo kao mmol ekvivalenta akarboze – ACE po gramu uzorka).

Tablica 6. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljem biljke *Hymenocrater bitumenosus* (37)

Uzorak	ACE
EO <i>Hymenocrater bitumenosus</i>	$0,91 \pm 0,09$ mmol ACE/g

ACE=ekvivalent akarboze

Salameh i suradnici su 2018 god. (33) istražili kemijski sastav hlapivih ulja biljke *Micromeria fruticosa* subsp. *serpyllifolia* s područja Palestine, West Bank regija (gradovi Hebron, Ramallah i Nablus). Uzorci su sakupljeni u travnju 2017. god. Hlapiva ulja izolirana su metodom ultrazvučne ekstrakcije mikrovalovima. GC-MS analiza hlapivih komponenti pokazala je visoki udio oksidiranih spojeva (86,1–89,88%), dok je neoksidiranih hlapivih spojeva bilo 4,38-4,71%. Najzastupljenija komponenta svih uzoraka ulja bio je pulegon (74,43-86,04%), dok je druga najzastupljenija komponenta ulja bio izomenton (3,16-14,41%). *M. fruticosa* subsp. *serpyllifolia* (Nabulus)- pulgeon 82,94%, izomenton 3,16%; *M. fruticosa* subsp. *serpyllifolia* (Ramallah)-pulgeon 86,04%, izomenton 3,84%; *M. fruticosa* subsp. *serpyllifolia* (Hebrom)-pulgeon 74,43%, izomenton 14,41%. Antiamilazna aktivnost hlapivih ulja testirana je metodom 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNSA metodom). Uzorak biljke iz Nablusa pokazao je najbolju antiamilaznu aktivnost s  $EC_{50}$  vrijednosti od 3,31  $\mu$ g/mL, dok su uzorci hlapivih ulja iz Ramallaha i Hebrona pokazali neznatno slabiju antiamilaznu aktivnost ( $EC_{50} = 3,40$  i 3,35  $\mu$ g/mL). Akarboza je pak inhibirala enzim  $\alpha$ -amilazu s 21,38  $\mu$ g/mL.

Tablica 7. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze uzorcima hlapivih ulja biljke *Micromeria fruticosa* subsp. *serpyllifolia* s različitih lokacija Palestine. West Bank regija (gradovi Hebron, Ramallah i Nablus) (33)

Uzorak	$EC_{50}$ (EO)	$EC_{50}$ (akarboza)
--------	----------------	----------------------

EO <i>M. fruticosa</i> subsp. <i>serpyllifolia</i> (Nabulus)	3,31 µg/mL	21,38 µg/mL
EO <i>M. fruticosa</i> subsp. <i>serpyllifolia</i> (Ramallah)	3,40 µg/mL	21,38 µg/mL
EO <i>M. fruticosa</i> subsp. <i>serpyllifolia</i> (Hebrom)	3,35 µg/mL	21,38 µg/mL

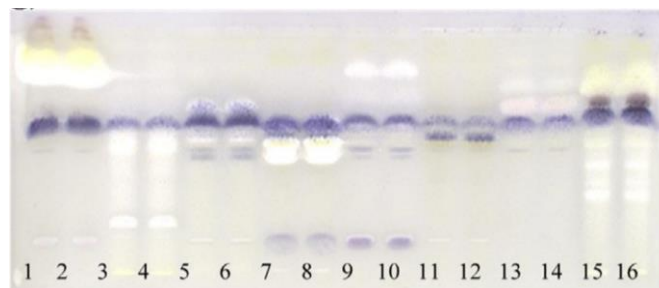
2018. god. Belhadj i sur. (38) su proveli istraživanje učinka eteričnog ulja biljke *Salvia officinalis* L. na dijabetes izazvan aloksanom kod štakora. Listovi kadulje prikupljeni su iz privatnog vrta koji se nalazi u gradu Sfaxu (centralno-istočna regija Tunisa) u travnju 2013. god. Eterično ulje izolirano je hidrodestilacijom u Clevenger aparaturi i analizirano GC-FID i GC-MS veznim sustavima. U uljima su identificirani, oksidirani monoterpeni (56,32%), neoksidirani monoterpeni (15,00%) i neoksidirani seskviterpeni (14,70%). Dominantne komponente ulja bili su  $\alpha$ - i  $\beta$ -tujon, 1,8-cineol, kamfor,  $\beta$ -kariofilen,  $\alpha$ - i  $\beta$ - pinen,  $\alpha$ -humulen i kamfen. Sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze *in vitro* testirana je metodom CNPG3 (2-kloro-*p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriozid). Ispitivanje je pokazalo da eterično ulje ima inhibicijsko djelovanje na  $\alpha$ -amilazu s vrijednosti  $EC_{50} = 38 \mu\text{g/mL}$ , u odnosu na vrijednost za akarbozu koja je iznosila  $EC_{50}=14,9 \mu\text{g/mL}$ .

Tablica 8. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze uzorcima eterična ulja biljke *Salvia officinalis* L. (38)

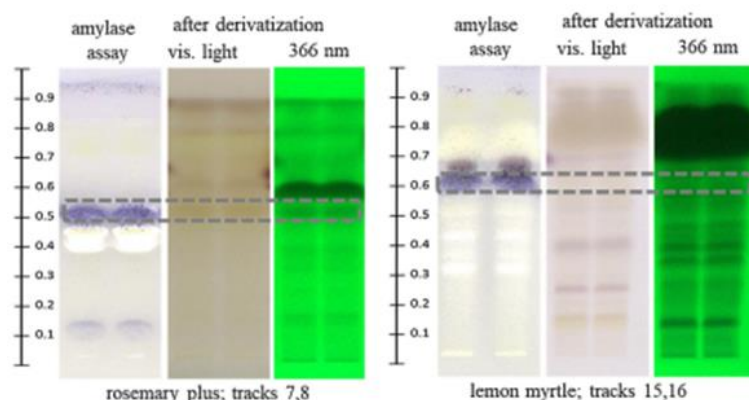
Uzorak	$EC_{50}$ (EO)	$EC_{50}$ (akarboza)
EO <i>Salvia officinalis</i> L	38 µg/mL	14,9 µg/mL

Kustrin i suradnici su 2019. godine (34) proveli *in vitro* istraživanje, antidijabetičkih i neuroprotektivnih učinka osam eteričnih ulja biljaka iz obitelji Lamiaceae. Eterična ulja dobivena su od cvijeta lavande, limunove mirte, origana, paprene metvice, kadulje i listova ružmarina, a njihov kemijski sastav procijenjen je HPTLC metodom (visokoučinkovita tankoslojna kromatografija). HPTLC kao otvoreni kromatografski sustav kompatibilan je s enzimskim (biokemijskim) i staničnim (biološkim) testovima, budući da se njegova mobilna faza može lako ukloniti nakon razvoja ploče i prije biotestiranja. Uzorci eterična ulja cvijeta lavande (*Lavandula officinalis*), limunove

mirte (*Backhousia citriodora*), listove origana (*Origanum vulgare*), paprene metvice (*Mentha piperita*), ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) i kadulje (*Salvia officinalis*) su iz komercionlnih izvora te ih je isporučila tvrtka Flavex Naturextrakte GmbH (Rehlingen, Njemačka), te je svaki uzorak pripremljen razrjeđivanjem eteričnog ulja s etil acetatom u omjeru 1:4 (v/v). Inhibicijska svojstva eteričnih ulja na  $\alpha$ -amilazu testirana su Škrob-jod metodom i zatim kvantificirana korištenjem akarboze ( $\geq 95\%$ ) kao standarda.  $\alpha$ -Amilaza je odgovorna za hidrolizu škroba u kraće polisaharide, odnosno dekstrine, maltozu i glukozu. Jod, s druge strane, tvori plavi do crni kompleks sa škrobom, ali ne reagira s glukozom. Stoga škrob koji nije bio hidroliziran  $\alpha$ -amilazom zbog inhibicije enzima spojevima prisutnim u eteričnim uljima, stvara tamnoplavu zonu na TLC ploči u prisutnosti joda. Višestruke zone inhibicije  $\alpha$ -amilaze uočene su kao tamnoplave trake na kromatografskim pločama. Svi uzorci su pokazali različite stupnjeve inhibicijske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze koje su prikazane na Slici 18. i Slici 19.



Slika 18. HPTLC otisci eteričnih ulja, bijelo svjetlo nakon testa inhibicije  $\alpha$ -amilaze, jažice 1, 2: list origana - tip fenola; jažice 3, 4: cvijet lavande; jažice 5, 6: list paprene metvice; jažice 7, 8: ekstrakt ružmarina; jažice 9, 10 list origana - tip terpineol; jažice 11, 12: ružmarin - cineol tip; jažice 13, 14: kadulja; jažice 15, 16 limunska mirta.(34)



Slika 19. HPTLC profili („otisaka prstiju“, engl. „Fingerprint“ ružmarina i limunske mirte nakon analize  $\alpha$ -amilaze i nakon derivatizacije s reagensom anisaldehyd/sumporna kiselina) (34)

S obzirom na lipofilnu prirodu eteričnog ulja, u ispitivanim eteričnim uljima nije uočen značajan sadržaj polifenola u usporedbi sa značajnim inhibicijskim aktivnostima na  $\alpha$ -amilazu (Tablica 9.).

Tablica 9. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljima iz cvijeta lavande (*Lavandula officinalis*) i limunove mirte (*Backhousia citriodora*) te listova origana (*Origanum vulgare*), paprene metvice (*Mentha piperita*), ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) i kadulje (*Salvia officinalis*) (34)

Uzorak	ACE
EO cvijet <i>Lavandula officinalis</i>	0,16 mg/ $\mu$ L
EO cvijet <i>Backhousia citriodora</i>	0,49 mg/ $\mu$ L
EO list <i>Origanum vulgare</i> (fenolni tip)	0,41 mg/ $\mu$ L
EO list <i>Origanum vulgare</i> (terpineol tip)	0,36 mg/ $\mu$ L
EO list <i>Mentha piperita</i>	0,41 mg/ $\mu$ L
EO <i>Rosmarinus officinalis</i> (cineol tip)	0,22 mg/ $\mu$ L
ekstrakt <i>Rosmarinus officinalis</i>	0,45 mg/ $\mu$ L
EO <i>Salvia officinalis</i>	0,18 mg/ $\mu$ L

ACE=ekvivalent akarboze

Antioksidativna aktivnost bila je povezana sa sadržajem fenola ( $R = 0,49$ ), dok je aktivnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze povezana s antioksidativnom aktivnošću ( $R = 0,20$ ) i sadržajem terpenoida/sterola ( $R = 0,31$ ). Najjača inhibicija uočena je u ekstraktima limunske mirte i ružmarina zbog prisutnosti monoterpena. Limunova mirta je dobar izvor citrala, alifatskog aldehida u klasi monoterpenoida, koji se bez obzira na koncentraciju inhibitora ili način miješanja pokazao kao najjači inhibitor  $\alpha$ -amilaze. Dakle, superiorni inhibitorski i neuroprotektivni potencijal eteričnih ulja ružmarina i kadulje može se pripisati zajedničkim učincima glavnih fenolnih i terpenskih sastojaka. HPTLC metoda s crticom omogućila je brzo bioanalitičko profiliranje vrlo složenih uzoraka eteričnog ulja (34).

Akramov i suradnici (2019) (39) proveli su istraživanje triju eteričnih ulja *Lagochilus* vrsta (*L. gypsaceus*, *L. inebrians* and *L. setulosus*) iz Uzbekistana. Navedene biljne vrste rasprostranjene su u Centralnoj Aziji te korištene u narodnoj medicini kao sedativ i hemostatik. Ulja su izolirana hidrodestilacijom. GC-MS analiza kemijskog sastava ulja



*L. gypsaceus* pokazala je da su najzastupljenije komponente ovog ulja linalool (11,97%),  $\beta$ -jonon (11,75%), *trans*-krizantenil acetat (7,15%) i  $\alpha$ -terpineol (7,40%). U ulju *L. inebrians* su najzastupljenije komponente *trans*-krizantenil acetat (9,40%), eugenol (7,01%), *trans*-verbenol (3,85%), biciklo [3.1.1] hept-3-en-2-on (3,76%) i pinokarvon (3,43%); dok u ulju *L. setulosus* dolaze 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol (19,78%), biciklo [3.1.1] hept-2-en-4-ol (5,43%), heksadekanska kiselina (5,39%), limonen (5,19%) i 2-heksenal (5,03%). Metoda testiranja inhibitorne sposobnosti na enzim  $\alpha$ -amilazu nije navedena u radu, a dani rezultati upućuju na to da je eterično ulje *L. setulosus* pokazalo je najbolju inhibiciju enzima  $\alpha$ -amilaze (53,83±1,79 mg ACAE (ekvivalent akarboze) / g ulja), dok su ulja *L. Inebrians* i *L. Gypsaceus* (14,34±1,02 i 34,17±6,14 mg ACAE / g ulja) pokazala slabiju sposobnost inhibicije ovog enzima.

Tablica 10. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljima biljaka roda *Lagochilus* (39)

Uzorak	ACE
EO <i>Lagochilus gypsaceus</i>	14,34±1,02 mg ACAE/g ulja
EO <i>Lagochilus inebrians</i>	34,17±6,14 mg ACAE/g ulja
EO <i>Lagochilus setulosus</i>	53,83±1,79 mg ACAE/g ulja

ACE=ekvivalent akarboze

Sarikurkcu i suradnici su 2019. godine (40) radili istraživanje kemijskog sastava eteričnog ulja biljke *Micromeria myrtifolia* i njegove biološke aktivnosti. Nadzemni dijelovi biljke (lišće, pupoljci i cvjetovi) *M. myrtifolia* prikupljeni su iz sela Nebiler, Kavaklidere-Mugla u travnju 2016.god. Eterično ulje je izolirano postupkom hidrodestilacije, a GC-MS analiza kemijskog sastava ulja pokazala je da su najzastupljenije komponente ovog ulja seskviterpenski ugljikovodici:  $\beta$ -kariofilen (40,8%) i  $\alpha$ -kopaen (17,9%), a zatim oksigenirani seskviterpen kariofilen oksid (13,5%). Sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze testirana je jod/kalij jodid metodom (IKI metoda). Eterično ulje ove aromatične biljne vrste pokazalo je snažne inhibicijske učinke na enzim  $\alpha$ -amilazu,  $EC_{50}=1,89\pm 0,02$  mg/mL. Istom studijom testiran je inhibicijski potencijal akarboze i on je iznosio  $EC_{50}=1,05\pm 0,01$  mg/mL.

Tablica 11. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljem biljke *Micromeria myrtifolia* (40)

Uzorak	EC <sub>50</sub> (EO)	EC <sub>50</sub> (akarboza)
EO <i>Micromeria myrtifolia</i>	1,89±0,02 mg/mL	1,05±0,01 mg/mL

Mohammed i suradnici (41) su 2020. god. proveli istraživanje kemijskog sastava te inhibicijske sposobnosti eteričnog ulja biljke *Ocimum basilicum* iz porodice Lamiaceae. Stabijike i lišće biljke sakupljeni su u siječnju 2017. iz područja Al Butana koje se nalazi u Sjevernom Sudanu. Eterično ulje je izolirano hidrodestilacijom, a GC-MS analiza kemijskog sastava ulja pokazala je da su najzastupljenije komponente metil kavikol (51,9%) i linalol (20,0%). Metoda testiranja inhibicijske aktivnosti na enzim  $\alpha$ -amilazu koja se koristila je metoda Caraway-Somogyj-a Jod/kalij jodid (IKI), a rezultat je iznosio 58,01±0,23 mg ACAE /g.

Tablica 12. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze uzorcima eteričnih ulja biljka *Ocimum basilicum* (41)

Testirani uzorak	ACE
EO <i>Ocimum basilicum</i>	58,01±0,23 mg ACAE/g

ACE=ekvivalent akarboze

Bahadori i suradnici su 2020. god. (42) istraživali kemijski sastav te utjecaj na zdravlje eteričnih ulja triju biljaka: *Stachys inflata*, *S. lavandulifolia* i *S. byzantina*. Nadzemni dijelovi biljka sakupljeni su u travnju 2017. u gradu Kermanshaha (provincija Kermanshah), na planinija Mishodaghi (Marand, pokrajina Istočni Azarbajjan) i u gradu Khalkhal (pokrajina Ardabil), u Iranu. Hidrodestilacijom su izolirana eterična ulja, a kemijski sastav im je identificiran GC-MS analizom. Glavne hlapive komponente *S. inflata* su germakren-D (21,6 %) i  $\beta$ -pinen (15,6 %), kod *S. lavandulifolia* dominiraju germakren-D (22,5 %) i  $\alpha$ -pinen (15,5 %), dok je *S. byzantina* sadržavala heksahidro farnezil aceton (25,7 %) i valeranon (17,1 %) kao glavne hlapive sastojke. Antiamilazna aktivnost eteričnih ulja ulja testirana je metodom 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNSA metodom). Sva tri ulja pokazala su sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze, *S. inflata* u vrijednosti od 0,52 mmol ACE/g EO, *S. lavandulifolia* u vrijednosti od 0,68 mmol

ACE/g EO i *S. byzantina* koja je pokazala najveću sposobnost inhibicije u vrijednosti od 0,74 mmol ACE/g EO

Tablica 13. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljima biljaka roda *Stachys* (42)

Uzorak	ACE
EO <i>Stachys inflata</i>	0,52±0,02 mmol ACE/g
EO <i>Stachys lavandulifolia</i>	0,68±0,01 mmol ACE/g
EO <i>Stachys byzantina</i>	0,74±0,02 mmol ACE/g

ACE=ekvivalent akarboze

Zengin i suradnici su 2021. god. (43) radili istraživanje kemijskog sastava i biološke aktivnosti eteričnog ulja biljke *Nepeta baytopii*, endemske vrste iz Turske. Eterično ulje izolirano je metodom hidrodestilacije iz nadzemnih dijelova biljke, dok se GC-MS analiza koristila za identifikaciju komponenata eteričnog ulja. Identificirano je 10 komponenti, a najzastupljenije su kariofilen oksid (39,3%) i spatulenol (15,6%). Inhibicijski potencijal ovog ulja enzim  $\alpha$ -amilazu testiran je metodom Caraway-Somogyj-a Jod/kalij jodid (IKI) te je iznosio  $0.24 \pm 0.01$  mmol ACAE/g uzorka (izraženo kao mmol ekvivalenta akarboze-ACE po gramu uzorka).

Tablica 14. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze uzorcima eterična ulja biljke *Nepeta baytopii* (43)

Uzorak	ACE
EO <i>Nepeta baytopii</i>	0,24±0,01 mmol ACAE/g

ACE=ekvivalent akarboze

Godine 2022. Zengin i suradnici (44) su proveli istraživanje kemijskog sastava te inhibicijske sposobnosti eteričnih ulja biljaka *Stachys byzantina*, *S. hissarica* i *S. betoniciflora* koji rastu u Uzbekistanu. Nadzemni dijelovi biljke *S. byzantina* sakupljeni su iz botaničkog polja instituta za kemiju biljnih tvari (blizu Taškenta, regija Taškent, Uzbekistan), biljke *S. hissarica* u gradu Chimgana (regija Taškent), a biljke *S. betoniciflora* u gradu Aksaya (blizu Taškenta, planinski lanac Pskem, Uzbekistan). Sve su biljke sakupljene u fazi cvatnje tijekom proljeća. Eterična ulja izolirana su

hidrodestilacijom u Clevenger aparaturi i analizirana GC-MS veznim sustavom. Oktadekanal (9,37%), eukaliptol (6,89%), linalol (6,66%) i *p*-cimen (5,2%) bili su najzastupljenije komponente *S. betoniciflora*. Glavne otkrivene komponente *S. hissarica* su benzaldehid (5,01%), *n*-heksadekanska kiselina (4,68%) i pulegon (4,68%). *n*-butil oktadecenoat (4,92%) i *n*-triakontan (4,25%) najvećim su postotkom pronađene u *S. byzantina*. Metoda testiranja, koja se koristila, inhibicije na enzim  $\alpha$ -amilazu je metoda Caraway-Somogyj-a Jod/kalij jodid (IKI). Najvišu inhibicijsku sposobnost pokazalo je eterično ulje *S. betoniciflora* ( $0,76 \pm 0,02$  mmol ACAE)/g ulja), a najnižu eterično ulje *S. byzantina* ( $0,59 \pm 0,01$  mmol ACAE)/g ulja)

Tablica 15. Inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljima biljaka roda *Stachys* (44)

<b>Uzorak</b>	<b>ACE</b>
EO <i>Stachys byzantina</i>	0,59±0,01 mmol ACAE/g
EO <i>Stachys hissarica</i>	0,68±0,02 mmol ACAE/g
EO <i>Stachys betoniciflora</i>	0,76±0,02 mmol ACAE/g

ACE=ekvivalent akarboze

Pregledom literature uočeno je da je do danas objavljen priličan broj radova na temu inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljima biljaka iz porodice Lamiaceae. To je bilo i za očekivati obzirom da se radi o velikog biljnoj porodici, s velikim brojem biljnih vrsta i s brojnim biološkim učincima ekstrakata dobivenih iz biljaka ove porodice.

Tijekom izolacije eteričnih ulja iz biljnog materijala, autori su koristili različite dijelove biljke (cijela biljka, list, cvijet), neki su koristili komercijalne biljne uzorke, neki nisu naveli izvor biljnog materijala.

Metoda koja je korištena tijekom testiranja  $\alpha$ -amilaznog učinka eteričnih ulja izoliranih iz ovih biljnih vrsta je uglavnom Caraway-Somogy jod/kalij jodid metoda (IKI metoda): neki autori su koristili i metodu s 3,5-dinitro salicilnom kiselinom (DNSA metoda). Svi autori su kao pozitivnu kontrolu (standard) koristili akarbozu.

Kod prezentacije rezultata, neku autori su rezultate prezentirali u obliku  $EC_{50}$  vrijednosti, a neki u obliku ACE (ekvivalent akarboze). Kod prezentacije  $EC_{50}$  vrijednosti, potrebno je isto učiniti i za pozitivnu probu (akarboza). Neki autori to nisu načinili ili taj rezultat nisu prikazali.  $EC_{50}$  vrijednost i ACE su prezentirani u različitim mjernim jedinicama (g/L, g/g, mol/g)

Obzirom na sve gore navedeno, posve je jasno da ne možemo zaključiti o eteričnom ulju s najboljom ili najlošijom antiamilaznom aktivnosti. Ono što se uočava to je da su ovi biljni ekstrakti izvrstan potencijal u smislu inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaza.

Među testiranim uzorcima uočava se da hlapiva ulja dobivena metodom ultrazvučne ekstrakcije mikrovalovima biljne vrste *Micromeria fruticosa* subsp. *serpyllifolia* s različitim lokacija Palestine (West Bank regija; gradovi Hebron, Ramallah i Nablus) pokazuju jako dobar antiamilazni potencijal ( $EC_{50}$ =3,35  $\mu$ g/mL, 3,40  $\mu$ g/mL i 3,31  $\mu$ g/mL), u odnosu na akarbozu ( $EC_{50}$ =21,38  $\mu$ g/mL). U sastavu ovih hlapivih ulja kao dominantne komponente dolaze pulegon i izomenton. (33)

Zamjetan inhibicijski potencijal na enzim  $\alpha$ -amilazu ima i eterično ulje biljke *Nepeta baytopii*. ACE vrijednost ovog ulja iznosi  $0,24 \pm 0,01$  mmol/L (43).

Eterična ulja biljaka roda *Stachys* iz Uzbekistana (*S. byzantina*, *S. hissarica*, *H. betoniciflora*) također pokazuju zamjetni antiamilazni potencijal (ACE=  $0,59 \pm 0,01$  mmol/g;  $0,68 \pm 0,02$  mmol/g;  $0,76 \pm 0,02$  mmol/g). I eterična ulja *Stachys* vrsta (*S. inflata*, *S. lavandulifolia* i *S. byzantina*) iz Irana pokazuju zamjetni potencijal (ACE= $0,52 \pm 0,02$  mmol/g;  $0,68 \pm 0,01$  mmol/g;  $0,74 \pm 0,02$  mmol/g). Glavne komponente ovih eteričnih ulja su germakren-D i  $\beta$ -pinen (*S. inflata*); germakren-D i  $\alpha$ -pinen (*S. lavandulifolia*); heksahidrofarnezil aceton i valeranon (*S. byzantina*). (42)

Eterična ulja cvjeta lavande (*Lavandula officinalis*) i kadulje (*Salvia officinalis*) pokazuju dobar antiamilazni potencijal s ACE=0,16 mg/ $\mu$ L i 0,18 mg/ $\mu$ L. Sličan potencijal pokazuju i ulje ružmarina, cineol tip (*Rosmarinus officinalis*) s ACE=0,22 mg/ $\mu$ L; ulje origana, terpineol tio (*Origanum vulgare*) s ACE=0,36 mg/ $\mu$ L; ulje lista mente (*Mentha piperita*) s ACE= 0,41 mg/ $\mu$ L; ulje lista origana, fenolni tip (*Origanum vulgare*) s ACE= 0,41 mg/ $\mu$ L, ulje biljke *Backhousia citiodora* s ACE= 0,49 mg/ $\mu$ L; ulje kadulje (*Salvia officinalis*) s ACE= 0,18 mg/ $\mu$ L.

Ostala testirana eterična ulja pokazuju nešto slabiji inhibicijski učinak na ovaj enzim.

Tablica 16: Tabela pregled literature na temu inhibicijski učinci eteričnih ulja biljaka porodice Lamiaceae na enzim  $\alpha$ -amilazu

Uzorak	Glavne komponente	Metoda inhibicije $\alpha$ -amilaze	EC <sub>50</sub> (EO)	EC <sub>50</sub> (akarboza)	ACE	Literaturna referenca
EO <i>Thymus spathulifolius</i>	timol (50,5%), borneol (16,7%) i karvakrol (7,7%).	IKI	7,19 ± 0,14 mg/mL	0,98 ± 0,05 mg/mL	-	32
EO <i>Thymbra capitata</i>	Karvakrol	IKI	0,8±0,0 mg/mL	nt	-	35
EO <i>Thymus albicans</i>	1,8-cineol	IKI	9,2±0,1 mg/mL	nt	-	35
EO <i>Thymus caespititius</i>	timol i karvakrol	IKI	1,1±0,1 mg/mL	nt	-	35
EO <i>Thymus carnosus</i>	kamfen i borneol	IKI	6,4±0,1 mg/mL	nt	-	35
EO <i>Thymus lotocephalus</i>	1,8-cineol	IKI	Nema aktivnosti	nt	-	35
EO <i>Thymus mastichina</i>	1,8-cineol	IKI	4,6±0,0 mg/mL	nt	-	35

EO <i>Sideritis galactica</i>	$\alpha$ -pinen (23%), $\beta$ -pinen (32,2%), $\beta$ -ocimen (9,5%), $\beta$ -kariofilen (16,9%), germakren-D (1,2%) i kariofilen oksid (1,2%).	IKI	0,899 mg/mL	0,548 mg/mL	-	36
EO <i>Hymenocrater bitumenosus</i> Fisch.	$\alpha$ -pinen (18,2%), $\beta$ -pinen (11,3%), <i>trans</i> -fitol (11,0%) i spatulenol (8,5%)	IKI	-	-	0,91±0,09 mmol ACE/g	37
VO <i>Micromeria fruticosa serpyllifolia</i> (Nablus)	pulegon (82,94%), izomenton (3,16%).	DNSA	3,31 $\mu$ g/mL	21,38 $\mu$ g/mL	-	33
VO <i>Micromeria fruticosa serpyllifolia</i> (Ramallah)	pulegon (86,04%), izomenton (3,84%).	DNSA	3,40 $\mu$ g/mL	21,38 $\mu$ g/mL	-	33
VO <i>Micromeria fruticosa serpyllifolia</i> (Hebrom)	pulegon (74,43%), izomenton (14,41%).	DNSA	3,35 $\mu$ g/mL	21,38 $\mu$ g/mL	-	33
EO <i>Salvia officinalis</i> L.	$\alpha$ - i $\beta$ -tujon, 1,8-cineol, kamfor, $\beta$ -kariofilen, $\alpha$ - i $\beta$ - pinen, $\alpha$ -humulen i kamfen.	CNPG3	3,31 $\mu$ g/mL	2,38 $\mu$ g/mL	-	38



EO cvijet ( <i>Lavandula officinalis</i> ),		IKI	-	-	0,16 mg/μL	34
EO ( <i>Backhousia citriodora</i> )		IKI	-	-	0,49 mg/μL	34
EO list <i>Origanum vulgare</i> (fenolni tip)		IKI	-	-	0,41 mg/μL	34
EO list <i>Origanum vulgare</i> (terpineol tip)		IKI	-	-	0,36 mg/μL	34
EO list <i>Mentha piperita</i>		IKI	-	-	0,41 mg/μL	34
EO <i>Rosmarinus officinalis</i> (cineol tip)		IKI	-	-	0,22 mg/μL	34
extrakt <i>Rosmarinus officinalis</i>		IKI	-	-	0,45 mg/μL	34
EO <i>Salvia officinalis</i>		IKI	-	-	0,18 mg/μL	34
EO <i>L. gypsaceus</i>	linalool (11-97%), β-jonon (11-75%), trans-krizantenil acetat (7-15%) i α-terpineol (7-40%)		-	-	14,34±1,02 mg /g	39

EO <i>L. inebrians</i>	<i>trans</i> -krizantenil acetat (9-40%), eugenol (7-01%), <i>trans</i> -verbenol (3-85%), biciklo [3.1.1] hept-3-en-2-on (3-76%) i pinokarvon (3-43%);		-	-	34,17±6,14 mg/g	39
EO <i>L. setulosus</i>	2,4-bis (1,1-dimetiletil) phenol (19-78%), biciklo [3.1.1] hept-2-en-4-ol (5-43%), heksadekanska kiselina (5-39%), limonen (5-19%) i 2-heksenal (5-03%).		-	-	53,83±1,79 mg/g	39
EO <i>Micromeria myrtifolia</i>	$\beta$ -kariofilen (40,8%), $\alpha$ -kopaen (17,2%), kariofilen oksid (13,5%).	IKI	1,89±0,02 mg/mL	1,05±0,01 mg/mL	-	40
EO <i>Ocimum basilicum</i>	metil kavikol (51,9%) i linalol (20,0%), metil cinamat (9,4 %)	IKI	-	-	58,01±0,23 mg/g	41
<i>Stachys inflata</i>	Germakren-D (21,6 %) i $\beta$ -pinen (15,6 %), $\beta$ -felandren (9,8 %), $\alpha$ -pinen (9,6 %), spatulenol (8,2 %).	DNSA	-	-	0,52±0,02 mmol ACE/g	42

<i>Stachys lavandulifolia</i>	germakren-D (22,5 %) i $\alpha$ -pinen (15,5 %), linalol (11,9%)	DNSA	-	-	0,68±0,01 mmol ACE/g	42
<i>Stachys byzantina</i>	heksahidro farnezil aceton (25,7%), valeranon (17,1%), <i>n</i> -heksadekanska kis. (10,9%),	DNSA	-	-	0,74±0,02 mmol ACE/g	42
EO <i>Nepeta baytopii</i>	kariofilen oksid (39,3%), spatulenol (15,6%), <i>n</i> -heksadekanska kis. (11,0%).	IKI	-	-	0,24±0,01 mmol ACAE/g	43
<i>Stachys byzantina</i>	<i>n</i> -butil oktadecenoat (4,92%) i <i>n</i> -triakontan (4,25%)	IKI	-	-	0,59±0,01 mmol ACAE/g	44
<i>Stachys hissarica</i>	benzaldehyd (5,01%), <i>n</i> -heksadekanska kiselina (4,68%) i pulegon (4,68%).	IKI	-	-	0,68±0,02 mmol ACAE/g	44

<i>Stachys betoniciflora</i>	Oktadekanal (9,37%), eukaliptol (6,89%), linalol (6,66%) i <i>p</i> -cimen (5,2%)	IKI	-	-	0,76±0,02 mmol ACAE/g	44
------------------------------	---	-----	---	---	-----------------------------	----

EO=eterično ulje; VO=hlapljivo ulje; IKI= Caraway-Somogyj-a Jod/kalij jodid (jodno škrobni test); DNSA= metoda s 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom; IC50=inhibicija 50%; ACE=ekvivalent akarboze

#### **4. ZAKLJUČAK**

Cilj ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaza eteričnim uljima biljaka porodice Lamiaceae.  $\alpha$ -Amilaza je jedan od važnih enzima u procesu probave ugljikohidrata, a samim tim je važan u patogenezi dijabetesa. Kao izvori podataka koristile su se dostupne relevantne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*.

Do danas je objavljen priličan broj radova na temu inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze eteričnim uljima biljaka iz porodice Lamiaceae. To je bilo i za očekivati obzirom da se radi o velikog biljnoj porodici, s velikim brojem biljnih vrsta i s brojnim biološkim učincima ekstrakata dobivenih iz biljaka ove porodice.

Tijekom izolacije eteričnih ulja iz biljnog materijala, autori su koristili različite dijelove biljke (cijela biljka, list, cvijet), neki su koristili komercijalne biljne uzorke, neki nisu naveli izvor biljnog materijala.

Metoda koja je korištena tijekom testiranja  $\alpha$ -amilaznog učinka eteričnih ulja izoliranih iz ovih biljnih vrsta je uglavnom Caraway-Somogy jod/kalij jodid metoda (IKI metoda; škrobno jodna metoda) Neki autori su koristili i metodu s 3,5-dinitro salicilnom kiselinom (DNSA metoda). Svi autori su kao pozitivnu kontrolu (standard) koristili akarbozu.

Kod prezentacije rezultata, neku autori su rezultate prezentirali u obliku  $EC_{50}$  vrijednosti, a neki u obliku ACE (ekvivalent akarboze). Za iskazivanje rezultata korištene su i različite mjerne jedinice.

Među testiranim uzorcima uočava se da hlapiva ulja dobivena metodom ultrazvučne ekstrakcije mikrovalovima biljne vrste *Micromeria fruticosa* subsp. *serpyllifolia* s različitih lokacija Palestine (West Bank regija; gradovi Hebrom, Ramallah i Nablus) pokazuju jako dobar antiamilazni potencijal u odnosu na akarbozu. U sastavu ovih hlapljivih ulja kao dominantne komponente dolaze pulegon i izomenton. (33)

Zamjetan inhibicijski potencijal na enzim  $\alpha$ -amilazu imaju eterično ulje biljke *Nepeta baytopii*, eterična ulja biljaka roda *Stachys* iz Uzbekistana (*S. byzantina*, *S. hissarica*, *H. betoniciflora*) te eterična ulja *Stachys* vrsta iz Irana (*S. inflata*, *S. lavandulifolia* i *S.*

*byzantina*)

Dobar inhibicijski potencijal među testiranim uljima pokazali su i eterično ulje cvjeta lavande (*Lavandula officinalis*), kadulje (*Salvia officinalis*), ružmarina, cineol tip (*Rosmarinus officinalis*), ulje origana, terpineol tip (*Origanum vulgare*), ulje lista mente (*Mentha piperita*), ulje lista origana, fenolni tip (*Origanum vulgare*) te ulje biljke *Backhousia citiodora*.

Ostala testirana eterična ulja pokazuju nešto slabiji inhibicijski učinak na ovaj enzim.

Konačno, teško i nemoguće je zaključiti o eteričnom ulju s najboljom ili najlošijom antiamilaznom aktivnosti. Ono što se uočava to je da su ovi biljni ekstrakti izvrstan potencijal u smislu inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaza



## **LITERATURA**

1. Gokhan Zengin, Mohamad Fawzi Mahomoodally, Abdurrahman Aktumsek, József Jekő, Zoltán Cziáky, Maria João Rodrigues, Luisa Custodio, Rıdvan Polat, Ugur Cakilcioglu, Adnan Ayna, Monica Gallo, Domenico Montesano and Carene Picot-Allain, Chemical Profiling and Biological Evaluation of *Nepeta baytopii* Extracts and Essential Oil: An Endemic Plant from Turkey, *Plants*, 10 (6) (2021) 1176, doi : <https://doi.org/10.3390/plants10061176>
2. Michał Tomczyk, Olcay Ceylan, Marcello Locatelli, Angela Tartaglia, Vincenzo Ferrone, Cengiz Sarikurkcu *Ziziphora taurica* subsp. *taurica*: Analytical Characterization and Biological Activities, *Biomolecules*, 9 (8) (2019) 367, doi: <https://doi.org/10.3390/biom9080367>
3. Hasya Nazlı EKİN, Didem DELİORMAN ORHAN, İlkay ERDOĞAN ORHAN, Nilüfer ORHAN, Mustafa ASLAN Evaluation of enzyme inhibitory and antioxidant activity of some Lamiaceae plants, *Journal of research in pharmacy*, 23 (4) (2019) 749-758 doi : <https://doi.org/10.12991/jrp.2019.184>
4. Ljiljana Jelenković, Vesna Stankov Jovanović, Ivan Palić, Violeta Mitić and Milanka Radulović In Vitro Screening of  $\alpha$ -Amylase Inhibition by Selected Terpenes from Essential Oils, *Trop. J. Pharm. Res.*, 13 (9) (2014) 1421, doi: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.7>
5. Snežana Agatonovic-Kustrin, Ella Kustrin, David W. Morton Essential oils and functional herbs for healthy aging, *Neural Regeneration Research*, 14(3) (2018) 441-445, doi: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.245467>
6. L. Stryer, *Biochemistry* II ed, Školska knjiga, Zagreb, 1991.
7. Ajita Sundarram and Thirupathihalli Pandurangappa Krishna Murthy.  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review, *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2 (4) (2014)166-175, doi: <https://doi.org/10.12691/jaem-2-4-10>
8. W.M. Fogarty, C.T. Kelly, Starch-degrading enzymes of microbial origin, in M.J. Bull (Ed.): *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 15, Elsevier Scientific, Amsterdam, 1979, str. 87–150.
9. Wikipediija.n.d „Alpha-amylase“ Pristupljeno:28.siječnja.2022. Dostupno na: [Alpha-amylase - Wikipedia](https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-amylase)
10. S.P. Tiwari, R. Srivastava, C.S. Singh, K. Shukla, R.K. Singh, P. Singh, R. Singh, N.L. Singh and R. Sharma, Amylases: an overview with special reference to alpha amylase, *Journal of Global Biosciences*, 4 (1) (2018) 1886-1901, doi:
11. Annabel Bijttebier, Hans Goesaert and Jan Delcour Amylase action pattern on starch polymers, *Biologia* 63/6, 989–999 (2008), doi: <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0169-x>

12. Paloma Michelle de Sales, Paula Monteiro de Souza, Luiz Alberto Simeoni, Pérola de Oliveira Magalhães, Dâmaris Silveira  $\alpha$ -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15 (1) (2012) 141 - 183, doi: <https://doi.org/10.18433/J35S3K>
13. Ivan Kopitović, *Interna medicina za studenta zdravstvene nege*. Novi Sad: Medicinski fakultet, 2017.
14. Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, Chou CJ., Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human  $\alpha$ -Amylase, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (2008) 3555-3561, doi: <https://doi.org/10.1021/jm800115x>
15. Gin H, Rigalleau V, Caubet O, Aubertin J., Effects of red wine, tannic acid, or ethanol on glucose tolerance in non-insulin dependent diabetic patients and on starch digestibility in vitro. *Metabolism*, 48 (1999) 1179-1183, doi: [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(99\)90135-x](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(99)90135-x)
16. Wikipedija.n.d „Tanini“ Pristupljeno:29.siječnja.2022. Dostupno na: [Tanin - Wikipedia](#)
17. Wikipedija.n.d.“Terpenoid“Pristupljeno:16.srpnja.2022. Dostupno na: [Terpenoid - Wikipedia](#)
18. Wissal Dhifi, Sana Bellili, Sabine Jazi, Nada Bahloul and Wissem Mnif, Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review, *Medicines*, 3 (4) (2016) 25, doi: <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
19. Ester Chamorro, Silvia N. Zambón, Walter Gustavo Morales, Gustavo 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, doi: <https://doi.org/10.5772/33201>
20. Kosová, K.; Klíma, M.; Prášil, I.T.; Vítámvás, P. COR/LEA Proteins as Indicators of Frost Tolerance in Triticeae: A Comparison of Controlled versus Field Conditions, *Plants*, 10 (4) (2021) 789, doi: <https://doi.org/10.3390/plants10040789>
21. Zygadlo JA, Juliani HR Jr (2000) Bioactivity of essential oil components. *Curr Top Phytochem* 3 203–214. Dostupno na: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_5)
22. Nicholas J. Sadgrove, Guillermo F. Padilla-González and Methee Phumthum, Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, *Methods of Analysis and Authentication*, *Plants* 11 (2022) 789, doi: <https://doi.org/10.3390/plants11060789>

23. Milan Stankovic, Lamiaceae Species: Biology, Ecology and Practical Uses, *Plants*, 11 (6) (2022) 789, doi: <https://doi.org/10.3390/plants11060789>
24. Klaudija Carović-Stanko, Klaudija Carović-Stanko, Marko Petek, Marko Petek, Martina Grdiša, Martina Grdiša, Zlatko Šatović Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods – a review, *Czech journal of food sciences*, 34 (2016) 377-390, doi: <https://doi.org/10.17221/504/2015-CJFS>
25. Wikipedija.n.d „Lamiaceae“ Pristupljeno: 29.siječnja 2022. Dostupno na: [Lamiaceae - Wikipedia](#)
26. Lawrence B.M. (1992): Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. In: Harley R.M., Reynolds T. (eds): *Advances in Labiate Science*. Richmond, Royal Botanic Gardens Kew: 399–436.
27. Zgorcka, G., Glowniak, K., Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26 (1) (2001) 79-87, doi: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00354-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00354-5)
28. Licina B.Z., Stefanovic O.D., Vasic S.M., Radojevic I.D., Dekic M.S., Comic L.R., Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L., *Food Control*, 33 (2013) 498–504, doi: [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(01\)00354-5](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(01)00354-5)
29. Wikipedijs.n.d „Kadulja“ Pristupljeno na:29.6.2022. Dostupno na: [Kadulja - Wikipedia](#)
30. Kwon YI, Vattem DA, Shetty K., Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 2006 15: 107–118, PMID: 16500886.
31. Stagos., D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D., Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (11) (2012) 4115-4124, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.033>
32. Ramazan Ceylan, Gokhan Zengin, Sengul Uysal, Veli Ilhan, Abdurrahman Aktumsek, Ali Kandemir & Farooq Anwar, GC-MS analysis and in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of essential oil from aerial parts of endemic *Thymus spathulifolius* Hausskn. et Velen., *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 (6) (2016) 983-90 , doi: <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1077822>
33. Nihaya Salameh, Naser Shraim and Nidal Jaradat, Chemical Composition and Enzymatic Screening of *Micromeria fruticosa serpyllifolia* Volatile Oils Collected from Three Different Regions of West Bank, Palestine, *BioMed Research International* (2018), doi: <https://doi.org/10.1155/2018/6536919>
34. Cristina Romero Rocamora, Kalavathy Ramasamy, Siong Meng Lim, Abu Bakar Abdul

- Majeed, Snezana Agatonovic-Kustrin, HPTLC based approach for bioassay-guided evaluation of antidiabetic and neuroprotective effects of eight essential oils of the Lamiaceae family plants, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 178 (2020) 112909, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112909>
35. Smail Aazza, Soukaina El-Guendouz, Maria Graça Miguel, M. Dulce Antunes, M. Leonor Faleiro, A. Isabel Correia and A. Cristina Figueiredo, Antioxidant, Anti-inflammatory and Anti-hyperglycaemic Activities of Essential Oils from *Thymbra capitata*, *Thymus albicans*, *Thymus caespitius*, *Thymus carnosus*, *Thymus lotocephalus* and *Thymus mastichina* from Portugal, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11 (7) (2016) 1029 – 1038 doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.11.016>
  36. Gökhan Zengin, Cengiz Sarıkürkçü, Abdurrahman Aktümsek i Ramazan Ceylan, Antioxidant Potential and Inhibition of Key Enzymes Linked to Alzheimer’s Diseases and Diabetes Mellitus by Monoterpene-Rich Essential Oil from *Sideritis galatica* Bornm. Endemic to Turkey, *Records of Natural Products*, 10:2 (2016) 195-206
  37. Shahram Bahadori, Mir Babak Bahadori, Gokhan Zengin, Filippo Maggi, Leila Dinparast & Abdurrahman Aktumsek, Chemical composition profile of the essential oil from *Hymenocrater bituminosus* and its health functionality., *International Journal of Food Properties*, 20 (1) (2017) 972–80, doi : <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2017.1325901>
  38. Sahla Belhadj, Olfa Hentati, Majdi Hammami, Aida Ben Hadj, Tahia Boudawara, Mohamed Dammak, Sami Zouari i AbdelFattah El Feki, Metabolic impairments and tissue disorders in alloxan-induced diabetic rats are alleviated by *Salvia officinalis* L. essential oil, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108 (2018) 985-995, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.108>
  39. Davlat Kh. Akramov, Gokhan Zengin, Sun Chul Kang, Komiljon Sh. Tojibaev, Mohamad Fawzi Mahomoodally, Shahnoz S. Azimova & Nilufar Z. Mamadalieva, Comparative study on the chemical composition and biological activities of the essential oils of 3 *Lagochilus* species collected from Uzbekistan, *Natural Product Research*, 35 (16) (2019) 2734-2738, doi : <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1655417>
  40. Cengiz Sarikurkcu, Olcay Ceylan, and Sanja Ćavar Zeljković, *Micromeria myrtifolia*: Essential Oil Composition and Biological Activity, *Natural Product Communications*, 14 (6) (2019) 1-3, doi: <https://doi.org/0.1177/1934578X19851687>
  41. Atif B.A. Mohammed, Sakina Yagi, Tzvetomira Tzanova, Herve Schohn, Haider Abdelgadir, Azzurra Stefanucci, Adriano Mollica, Mohamad Fawzi Mahomoodally, Talal A. Adlan i Gokhan Zengin, Chemical profile, antiproliferative, antioxidant and enzyme inhibition activities of *Ocimum basilicum* L. and *Pulicaria undulata* (L.) C.A. Mey. grown

- in Sudan, *South African Journal of Botany*, 132 (2020) 403-409, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.06.006>
42. Mir Babak Bahadori, Filippo Maggi, Gokhan Zengin, Behvar Asghari, Morteza Eskandani, Essential oils of hedgenettles (*Stachys inflata*, *S. lavandulifolia*, and *S. byzantina*) have antioxidant, anti-Alzheimer, antidiabetic, and anti-obesity potential: A comparative study, *Industrial Crops and Products*, 145 (2020) 112089, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112089>
43. Gokhan Zengin, Mohamad Fawzi Mahomoodally, Abdurrahman Aktumsek, József Jek, Zoltán Cziáky, Maria João Rodrigues, Luisa Custodio, Ridvan Polat, Ugur Cakilcioglu, Adnan Ayna, Monica Gallo 8, Domenico Montesano i Carene Picot-Allain, Chemical Profiling and Biological Evaluation of *Nepeta baytopii* Extracts and Essential Oil: An Endemic Plant from Turkey, *Plants*, 10 (2021) 1176, doi: <https://doi.org/10.3390/plants10061176>
44. Gokhan Zengin, Haidy A. Gad, Elbek A. Mukhammadiev, Nawal M. Al Musayeib, Hidayat Hussain, Ismail Bin Ware, Mohamed L. Ashour i Nilufar Z. Mamadalieva, Chemometric Analysis Based on GC-MS Chemical Profiles of Three *Stachys* Species from Uzbekistan and Their Biological Activity, *Plants*, 11 (2022) 1215, doi: <https://doi.org/10.3390/plants11091215>