

# Inhibicija enzima eteričnim uljem artemisiae vrsta

---

Dujmović, Klara

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:848046>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

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

**INHIBICIJA ENZIMA ETERIČNIM ULJIMA *ARTEMISIAE* VRSTA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KLARA DUJMOVIĆ**

**Matični broj: 434**

**Split, rujan 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**INHIBICIJA ENZIMA ETERIČNIM ULJIMA *ARTEMISIAE* VRSTA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KLARA DUJMOVIĆ**

**Matični broj: 434**

**Split, rujan 2022.**

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

**ENZYME INHIBITION BY ESSENTIAL OILS OF *ARTEMISIAE***  
**SPECIES**

**BACHELOR THESIS**

**Klara Dujmović**

**Parent number: 434**

**Split, September 2022.**

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

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

## INHIBICIJA ENZIMA ETERIČNIM ULJIMA *ARTEMISIAE* VRSTA

Klara Dujmović, 434

**Sažetak:** Cilj ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu in vitro inhibicije enzima eteričnim uljima biljaka roda *Artemisiae*. Brojna bolesna stanja u ljudi tretiraju se ili preveniraju na način da se enzimi ključni u procesima vezanim uz pojedina bolesna stanja inhibiraju. Obzirom da se uz lijekove koji se koriste u tretmanima ovih i sličnih bolesti vezuju i određene nuspojave, znanstvena zajednica je u stalnoj potrazi za tvarima izoliranim iz prirode koji će pomoći u tretmanu pojedinih bolesti. Kao izvori podataka koristile su se dostupne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*.

Deset biljnih vrsta roda *Artemisia* testirano je na sposobnost njihovih eteričnih ulja da inhibiraju enzime koji imaju važnu ulogu u tretmanu bolesti u ljudi. To su vrste: *A. absinthium*, *A. alba*, *A. annua*, *A. arborescens*, *A. aucheri*, *A. campestris*, *A. fragrans*, *A. infranensis*, *A. macrocephala* i *A. maderaspatana*. Enzimi koji su pri tom ispitivani su AChE, BChE,  $\alpha$ -amilaza,  $\alpha$ -glukozidaza, tirozinaza, ACE, COX-1 i COX-2. Rezultati su pokazali da eterično ulje izolirano iz nadzemnog dijela biljke *A.alba* iz Alžira pokazuje najbolju sposobnost inhibicije, osobito enzima AChE i BChE. Dobar inhibicijski učinak ovo eterično ulje pokazuje i na enzim  $\alpha$ -amilazu. Eterično ulje iste vrste iz nadzemnih dijelova *A.alba* iz Maroka pokazuje srednje dobar inhibicijski učinak na enzim  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu. Eterično ulje *A.infranensis* izolirano iz nadzemnog dijela biljke sabrane u Maroku pokazalo je srednje dobru sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Sva ostala testirana eterična ulja pokazuju lošu sposobnost inhibicije testiranih enzima ili se njihov inhibicijski potencijal ne može procijeniti.

**Ključne riječi:** *Artemisia*, eterična ulja, inhibicija enzima

**Rad sadrži:** 49 stranica, 36 slika, 11 tablica, 81 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. doc.dr.sc. Franko Burčul	predsjednik
2. doc.dr.sc. Mario Nikola Mužek	član
3. prof.dr.sc. Olivera Politeo	mentor

**Datum obrane:** 27. rujna 2022.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Undergraduate study of Chemistry

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

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

**Mentor:** PhD Olivera Politeo, full professor

### ENZYME INHIBITION BY ESSENTIAL OILS OF *ARTEMISIAE* SPECIES

Klara Dujmović, 434

**Abstract:** The aim of this bachelor thesis was to review available scientific literature on the topic of in vitro enzyme inhibition by essential oils of the genus *Artemisiae*. Numerous human diseases are treated or prevented by enzyme inhibition. Since certain adverse reactions are associated with medicines used in the treatment of these and similar diseases, the scientific community is constantly searching for substances isolated from nature that would help treat these diseases. Available scientific databases Web of Science Core Collection and Scopus were used as data sources.

Ten plant species of the *Artemisia* genus were tested for the ability of their essential oils to inhibit enzymes that play an important role in treating diseases in humans. These are: *A. absinthium*, *A. alba*, *A. annua*, *A. arborescens*, *A. aucheri*, *A. campestris*, *A. fragrans*, *A. infranensis*, *A. macrocephala* and *A. maderaspatana*. The enzymes that are inhibited are AChE, BChE,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, tyrosinase, ACE, COX-1 and COX-2. The results showed that essential oil isolated from the superground part of *Artemisia alba* from Algeria shows the best inhibitory capability, especially the enzymes AChE and BChE. Good inhibitory effect of this oil also affects  $\alpha$ -amylase enzymes. Essential oil of the same species from the superground parts of the *A. alba* from Morocco shows a medium inhibitory effect on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. *A. infranensis* essential oil isolated from the superground part of Morocco's plant has shown a medium capacity to inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. All other tested essential oils show poor ability to inhibit tested enzymes or their inhibitory potential cannot be estimated.

**Keywords:** *Artemisia*, enzyme inhibition, essential oil

**Thesis contains:** 49 pages, 36 figures, 11 tables, 81 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. PhD Franko Burčul, assistant professor      | chair person |
| 2. PhD Mario Nikola Mužek, assistant professor | member       |
| 3. PhD Olivera Politeo, full professor         | supervisor   |

**Defence date:** 27th 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 izrađen je na Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Olivera Politeo u razdoblju od lipnja do rujna 2022. godine.*

*Zahvaljujem ponajprije svojoj mentorici prof. dr. sc. Oliveri Politeo, na strpljenju, objašnjenjima i korisnim savjetima prilikom pisanja ovog rada. Također, neizmerno hvala mojim roditeljima, sestri i bratu, te baki Ani na razumijevanju, ljubavi i bezuvjetnoj podršci koju mi pružaju tijekom cijelog školovanja.*

## SAŽETAK

Cilj ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu *in vitro* inhibicije enzima eteričnim uljima biljaka roda *Artemisiae*. Brojna bolesna stanja u ljudi tretiraju se ili preveniraju na način da se enzimi ključni u procesima vezanim uz pojedina bolesna stanja inhibiraju. Obzirom da se uz lijekove koji se koriste u tretmanima ovih i sličnih bolesti vezuju i određene nuspojave, znanstvena zajednica je u stalnoj potrazi za tvarima izoliranim iz prirode koji će pomoći u tretmanu pojedinih bolesti. Kao izvori podataka koristile su se dostupne znanstvene baze podataka *Web of Science Core Collection* i *Scopus*.

Deset biljnih vrsta roda *Artemisia* testirano je na sposobnost njihovih eteričnih ulja da inhibiraju enzime koji imaju važnu ulogu u tretmanu bolesti u ljudi. Te su vrste: *A. absinthium*, *A. alba*, *A. annua*, *A. arborescens*, *A. aucheri*, *A. campesteris*, *A. fragrans*, *A. infranensis*, *A. macrocephala* i *A. maderaspatana*. Enzimi koji su pri tom inhibirani su AChE, BChE,  $\alpha$ -amilaza,  $\alpha$ -glukozidaza, tirozinaza, ACE, COX-1 i COX-2. Rezultati su pokazali da eterično ulje izolirano iz nadzemnog dijela biljke *A. alba* iz Alžira pokazuju najbolju sposobnost inhibicije, osobito enzima AChE i BChE. Dobar inhibicijski učinak ovo eterično ulje pokazuje i na enzim  $\alpha$ -amilazu. Eterično ulje iste vrste iz nadzemnih dijelova *A. albae* iz Maroka pokazuje srednje dobar inhibicijski učinak na enzim  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu. Eterično ulje *A. infranensis* izolirano iz nadzemnog dijela biljke sabrane u Maroku pokazalo je srednje dobru sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Sva ostala testirana eterična ulja pokazuju lošu sposobnost inhibicije testiranih enzima ili se njihov inhibicijski potencijal ne može procijeniti.

**Ključne riječi:** *Artemisia*, eterična ulja, inhibicija enzima

## SUMMARY

The aim of bachelor thesis was to review available scientific literature on the topic of *in vitro* enzymes inhibition by essential oils of plants of the genus *Artemisiae*. Numerous human diseases are treated or prevented by enzyme inhibition. Since certain adverse reactions are associated with medicines used in the treatment of these and similar diseases, the scientific community is constantly searching for substances isolated from nature that will help treat certain diseases. Available scientific databases *Web of Science Core Collection* and *Scopus* were used as data sources

Ten plant species of the *Artemisia* genus were tested for the ability of their essential oils to inhibit enzymes that play an important role in treating diseases in humans. These are: *A. absinthium*, *A. alba*, *A. annua*, *A. arborescens*, *A. aucheri*, *A. campesteris*, *A. fragrans*, *A. infranensis*, *A. macrocephala* and *A. maderaspatana*. The enzymes that are inhibited are AChE, BChE,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, tyrosinase, ACE, COX-1 and COX-2. The results showed that essential oil isolated from the superground part of *Artemisia alba* from Algeria shows the best inhibitory capability, especially the enzymes AChE and BChE. Good inhibitory effect of this oil also affects  $\alpha$ -amylase enzymes. Essential oil of the same species from the superground parts of the *A. alba* from Morocco shows a medium inhibitory effect on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. *Artemisia infranensis* essential oil isolated from the superground part of Morocco's plant has shown a medium capacity to inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. All other tested essential oils show poor ability to inhibit tested enzymes or their inhibitory potential cannot be estimated.

**Key words:** *Artemisia*, essential oil, enzyme inhibition

## Sadržaj

UVOD .....	1
1 OPĆI DIO .....	2
1.1 Pelini .....	2
1.1.1 <i>Artemisia annua</i> L. ....	3
1.1.2 <i>Artemisia absinthium</i> L. ....	4
1.1.3 <i>Artemisia vulgaris</i> L. ....	5
1.1.4 <i>Artemisia dracunculus</i> L. ....	5
1.1.5 <i>Artemisia alba</i> L. ....	6
1.1.6 <i>Artemisia maritima</i> L. ....	7
1.1.7 <i>Artemisia fragrans</i> .....	8
1.1.8 <i>Artemisia camphorata</i> .....	9
1.1.9 <i>Artemisia ifranensis</i> .....	9
1.1.10 <i>Artemisia arborescens</i> L. ....	9
1.2 Eterična ulja.....	10
1.2.1 Dobivanje eteričnih ulja .....	11
1.2.2 Sastavnice eteričnog ulja.....	13
1.2.3 Glavne komponente eteričnog ulja vrsta <i>Artemisiae</i> .....	16
1.3 Inhibicija enzima.....	17
1.3.1 Enzimi inhibirani od strane eteričnih ulja <i>Artemisiae</i> .....	20
2 EKSPERIMENTALNI DIO .....	26
2.1 Metode određivanja inhibicijske sposobnosti .....	26
2.1.1 Test inhibicije enzima tirozinaze.....	26
2.1.2 Test inhibicije enzima AChE i BChE .....	28
2.1.3 Test inhibicije $\alpha$ -glukozidaze .....	30
2.1.4 Test inhibicije enzima $\alpha$ -amilaze.....	31
3 REZULTATI I RASPRAVA .....	32
4 ZAKLJUČAK.....	49
5 LITERATURA .....	50



## UVOD

Rod *Artemisia* L. jedan je od najvećih i najrasprostranjenijih rodova porodice *Asteracea* koji obuhvaća oko 500 vrsta. Vrste roda *Artemisiae* uglavnom prevladavaju u Europi, Aziji te sjevernoj Americi odnosno suhim područjima sjevernog umjerenog pojasa. Još od antičkih vremena ljudi su pojedino ljekovito i aromatično bilje roda *Artemisiae* koristili za izradu nakita i ukrasa, ali isto tako i za dobivanje eteričnih ulja koja su našla svoju primjenu u narodnoj i suvremenoj medicini kao i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Zbog širokog spektra bioaktivnih kemijskih spojeva, eterična ulja spomenutih vrsta imaju antibakterijsko, antiparazitsko i antifugalno djelovanje kao i mnoga druga. Eterična ulja pelina imaju izrazito gorak okus zbog prisutnosti artabsina (seskviterpenski laktone) i absintina (dimer seskviterpenskog laktone). Sastav eteričnih ulja nije stalan i ovisi o više čimbenika kao što su: geografski položaj, klimatskim uvjeti, obrada tla, pH tla, obrada biljke nakon branja te metoda ekstrakcije. Enzimi, katalizatori u živim sustavima, važni su molekularni uređaji koji usmjeruju kemijske pretvorbe te posreduju u pretvorbi jednog oblika energije u drugi. Inhibicija enzimske aktivnosti predstavlja glavni kontrolni mehanizam u biološkim sustavima. Aktivnost mnogih enzima može se inhibirati vezanjem malih molekula i iona. Mnogi lijekovi i otrovi djeluju kao inhibitori enzima. Danas se pak znanost okreće traženju novih inhibitora izoliranih iz prirodnih izvora kao što su biljke. Eterična ulja roda *Artemisiae* pokazala su se učinkovitim inhibitorima određenih enzima te su našla svoju primjenu u prevenciji i liječenju određenih bolesti.

Cilj ovog rada je pregled literature na temu inhibicije enzima eteričnim uljima biljaka roda *Artemisiae*.

# 1 OPĆI DIO

## 1.1 Pelini

Biljne vrste roda *Artemisiae* su jednogodišnji, dvogodišnji ili višegodišnji grmovi ili polugrmovi uspravnih stabljika. Naseljavaju sve kontinente osim Antartike, a i rasprostranjene su po cijeloj Hrvatskoj gdje broje 15 vrsta. Pelin je poznat po neugodnom gorkom okusu i karakterističnom mirisu, a kao ljekovita biljka poznata je još od starih Rimljana. (1) Latinski naziv roda, *Artemisia* L., potječe od imena grčke božice mjeseca, lova, brjegova i šuma Artemide. Aromatične biljke, kao što su pelini, zbog svojih antimikrobnih djelovanja često se koriste u tradicionalnoj medicini, a najviše za suzbijanje infekcija probavnog i respiratornog trakta. Zbog svog antioksidacijskog djelovanja, koriste se i kao dodatak prehranbenim proizvodima kako bi zaustavili ili usporili oksidacijsku razgradnju. (2) Danas je poznato oko 400 vrsta pelina, a najpoznatiji od njih su *Artemisia absinthium* L., *Artemisia annua* L., *Artemisia alba* L., *Artemisia dracunculus* L., *Artemisia vulgaris* L. i druge. Eterična ulja dobivena destilacijom vodenom parom smjese su prirodnih hlapljivih spojeva čije je antifugalno i antiparazitsko djelovanje dokazano u nekoliko znanstvenih studija. (3) S obzirom na prisutnost nekih toksičnih komponenti, u nekim zemljama zabranjena je upotreba biljaka roda *Artemisiae*, dok je u drugim zemljama ta količina ograničena. SAD je ograničio količine tujona, otrovne komponente pelina, u alkoholnim pićima na 10 mg/kg, dok je s druge strane uredbom europske unije količina tujona u alkoholnim pićima ograničena na 35 mg/kg.(4)

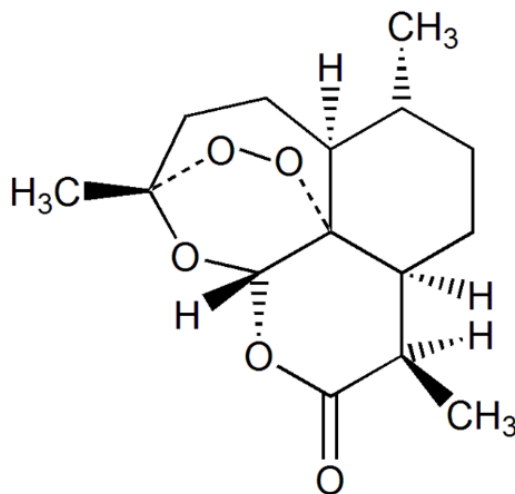




Slika 1. Pelin (5)

### 1.1.1 *Artemisia annua* L.

Mirisni ili slatki pelin *Artemisia annua* L., jednogodišnja je zeljasta biljka, u tradicionalnoj medicini koristi se već više od 2000 godina u svrhu jačanja imuniteta, suzbijanja vrućice, ublažavanje bolova i upala u tradicionalnoj medicini, borbu protiv virusa, parazita i bakterija. Slatki pelin je biljka koja može narasti u visinu do 150 cm (200 cm). Prirodno stanište ove biljke je umjereni pojas Azije, od Japana do Europe, te Balkanski poluotok. Kod nas se periodično javlja od Dalmacije do Slavonije.(6) Artemizin, aktivna tvar izolirana iz slatkog pelina, se od davnina koristi za liječenje malarije, ali također pokazuje i aktivno djelovanje protiv parazita i virusnih infekcija. (7)



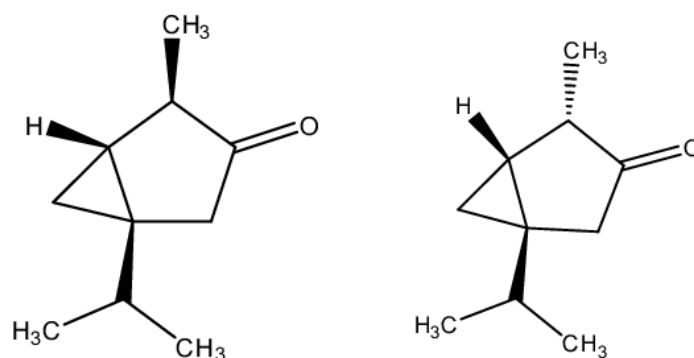
Slika 2. Artemizin (7)

Također, novija istraživanja pokazuju izvrsne rezultate i učinkovitost ove biljke kod najtežih oblika karcinoma. Čisti organizam od kancerogenih stanica selektivno ih uništavajući. Treba

naglasiti da artemizinin ima antibakterijsko, antigljivično i antivirusno djelovanje. Uništava širok spektar parazita koji žive u organizmu i može se koristiti preventivno. Slatki pelin je jedna od rijetkih biljaka koja uništava odrasle parazite i njihova jajašca. (8)

### 1.1.2 *Artemisia absinthium* L.

Obični, gorski ili pravi pelin (*Artemisia absinthium* L.) višegodišnja je zeljasta biljka polugrmastog oblika iz porodice glavočika (*Asteraceae*). Stabljika je uspravna i razgranata, naraste i preko 1 metar u visinu. Kao gorka biljka pelin se smatra odličnim sredstvom kod poticanja žuči i neprimjerene probave. U narodnoj medicini služio je i za liječenje protiv crvenih parazita. Svi dijelovi biljke sadrže eterično ulje koje, premda potiče rad jetre i izlučivanje žuči, zbog tujona uzrokuje degenerativne promjene središnjeg živčanog sustava i tjelesno propadanje. Poznato je i pripremanje alkoholnih pića od pelina kod nas zvano pelinkovac. Drugi, daleko poznatiji liker u svijetu je apsint kojem se još dodaju anis i komorač. S obzirom na činjenicu da je apsint sadržavao visok postotak alkohola, u razdoblju prohibicije zabranjen je upravo zbog ranije spomenutog tujona, za kojeg se smatralo da izaziva halucinacije.(9)



Slika 3.  $\alpha$ -tujon i  $\beta$ -tujon (10)

Tujon je keton i monoterpen koji se pretežno javlja u dva diastereomerna oblika: (-)- $\alpha$ -tujon i (+)- $\beta$ -tujon. Na temelju prijašnjih istraživanja koja su promatrala samo molekularni oblik, smatralo se da tujon djeluje slično THC -u (tetrahidro kanabinol) na kanabinoidne receptore; međutim, to se u međuvremenu pokazalo netočnim. Tujon je antagonist GABA receptora ( $\gamma$ -aminomaslačna kiselina ili 4-aminobutanska kiselina GABA). Inhibicijom

aktivacije GABA receptora, neuroni se mogu lakše aktivirati, što može uzrokovati grčeve mišića i konvulzije. Ova interakcija s GABA receptorom specifična je za  $\alpha$ -tujon. (11)

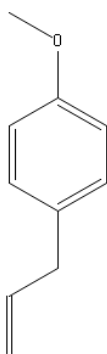
### **1.1.3 *Artemisia vulgaris* L.**

Obični ili divlji pelin (*Artemisia vulgaris* L.) zeljasta je trajnica iz porodice glavočika (*Asteraceae*). Stabljika je razgranata, poludrvenasta, uglasta, često crvenkasta i naraste do 180 cm visine. Korijen je drvenast, snažan i razgranat. Listovi su nasuprotni, perasto razdijeljeni, dugi 5-15 cm. Cvjetovi su skupljeni u klasaste cvatove na vrhovima stabljika. Dobra je medonosna biljka koja pčelama daje nektar i pelud. Prirodno je rasprostranjen na području Europe, Azije, i sjeverne Afrike. U Sjevernoj Americi je udomaćena i smatra se korovom. Raste na sunčanim i suhim mjestima, na plodnom tlu te uz obale rijeka i uz puteve. Traži hranjivo, pjeskovito tlo. Ne zahtijeva posebnu njegu, otporan je prema štetočinama, te potiskuje susjedne biljke. Osim toga, otporan je na sušu te vrlo dobro podnosi hladnoću. Divlji pelin ima široku primjenu u prehrambenoj i kemijskoj industriji te medicini. Cvjetni vrhovi i listovi skupljaju se u fazi cvjetanja te se zatim suše na suhom i prozračnom mjestu. Koriste se kao začim različitim jelima. Pobuđuju apetit, olakšavaju probavljanje masnoća, smiruju grčeve i primjenjuju se kao sredstvo za jačanje živaca. No, s obzirom da sadrže toksični tujon koriste se u vrlo malim količinama. Životinje na ispaši ju zbog neugodnog mirisa izbjegavaju, kao krmna biljka djeluje škodljivo i u malim udjelima. U literaturi je zabilježeno biocidno djelovanje protiv insekata, nametnika i gljivica. (12)

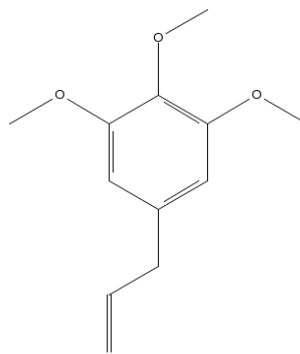
### **1.1.4 *Artemisia dracunculus* L.**

Estragon ili estragonski pelin višegodišnja je biljka porijeklom iz Sibira, a danas je rasprostranjen i na području Europe, Azije i Sjeverne Amerike. Stabljika je razgranata i naraste do 150 cm visine. Rizom je duguljast i zmijolik. Listovi su lancetasti, sjajno zeleni te ugodnog aromatičnog mirisa. Cvjetovi su dvospolni, žućkasto-zeleni i okrugli, veliki 2 cm - 4 cm, a oprašuju se vjetrom. Razlikuju se francuski estragon, najcjenjeniji od svih estragona, sadrži oko 3% eteričnog ulja i ruski estragon u formi divljeg estragona i slabije arome. Listovi, cvjetovi i generalno nadzemni dijelovi biljke sakupljaju se u toplim mjesecima sve do jeseni. Svježi ili osušeni listovi koriste se kao začim, a najbolji su kada se beru neposredno

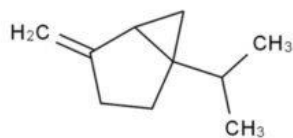
prije cvatnje. Često se koriste u francuskoj i talijanskoj kuhinji, a dobro djeluju kod nadutosti i kod bolova u probavnom sustavu. Svježa zelen ima oko 0,1 % - 0,4 % eteričnog ulja. Destilacijom vodenom parom nadzemnog dijela dobiva se eterično ulje. Dva su značajna kemotip; estragol kemotip koji je izrazito jak spazmolitik i karminativ, a koristi se kod dismenoreje, nadutosti, spazma, bolova raznih uzroka (glavobolje, migrene, menstrualni bolovi i sl.); dok se kemotip bogat elemicinom i sabinenom koristi kod slabe probave te za poticanje apetita. (13)



**Slika 4.** Estragol (14)



**Slika 5.** Elemicin (15)



**Slika 6.** Sabinen (16)

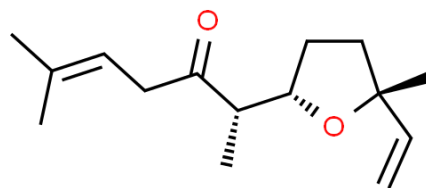
### 1.1.5 *Artemisia alba* L.

Naziv *Artemisia herba alba* L., dolazi od latinskog i znači bijeli pelin. Obično raste u suhim stepama mediteranskih regija u sjevernoj Africi, zapadnoj Aziji i jugoistočnoj Europi. Koristi se kao antiseptik i antispazmodik u biljnoj medicini. Eterično ulje *A. alba*, iz Sinajske pustinje, sadrži uglavnom 1,8-cineol i značajne količine  $\alpha$ -/ $\beta$ -tujona, kao i druge

oksigenirane monoterpen uključujući terpinen-4-ol, kamfor i borneol . Davanon, krizantenon i *cis*-krizantenol opisani su kao glavni sastojci u nekim populacijama *A. herba-alba* iz Maroka i Španjolske. (17)



Slika 7. *Artemisia alba* (17)



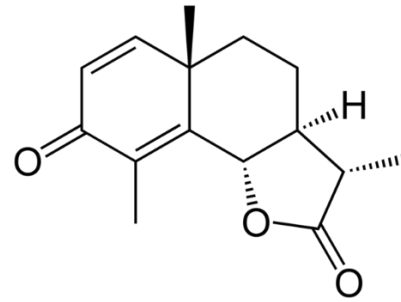
Slika 8. Davanon (18)

### 1.1.6 *Artemisia maritima* L.

Primorski pelin hrvatski je naziv za *Artemisia maritima* L.. Uglavnom raste na slanim i vlažnim tlima, a može se naći i na obalama Jadrana. Zeljasta je trajnica ili polugrm visine do 60 cm. Donji listovi stabljike su dvostruko do četverostruko perasto rascijepljeni. Cvate u rujnu i listopadu. Cvatne glavice su skupljene u metličaste, katkada gotovo grozdaste cvatove. Vanjski listići ovoja su eliptični. Najčešće raste uz more. Čaj od lišća ovog pelina se u tradicionalnoj medicini koristi kod problema s probavom, dok se čaj od stabljike koristi kod eritremije. Biljka je izvor seskviterpenoida santonina. (19)



**Slika 9.** *Artemisia maritima* L. (20)



**Slika 10.** Santonin (21)

### 1.1.7 *Artemisia fragrans*

*Artemisia fragrans* je višegodišnja biljka jakog mirisa koja raste u Iranu, Rusiji i na susjednim područjima. Bogata je derivatima monoterpena i seskviterpena koji djeluju protuupalno. Dominantni sastojci eteričnog ulja ove vrste su 1,8-cineol, kamfor,  $\alpha$ -tujon i  $\beta$ -tujon. Eterično ulje zbog svog sastava ima antibakterijsko i antioksidacijsko djelovanje. (22)



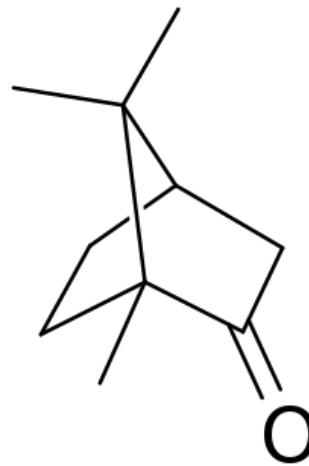
**Slika 11.** *Artemisia fragrans* L. (23)

### 1.1.8 *Artemisia camphorata*

Kamforovim pelinom se još može nazvati *Artemisia camphorata* koja je dobila naziv po najzastupljenijem spoju, kamforu, čijim osvježavajućim mirisom može biti prepoznata. Vjeruje se da potječe iz Europe i sa sjevera Afrike. Raste u obliku okruglog zimzelenog grma do 1,5 m visine koji uspijeva na suhom i dreniranom tlu te dobro podnosi nepovoljne uvjete (ekstremnu hladnoću, mraz i vrućine). Može podnijeti temperature do ispod -20 °C. Aromatičan miris biljke potječe iz njenih sivo-zeleno-srebrnih listova koji dolazi do izražaja nakon kiše i u sušnom razdoblju. (24)



Slika 12. *Artemisia camphorata*. (24)



Slika 13. Kamfor. (25)

### 1.1.9 *Artemisia ifranensis*

Smatra se rijetkim endemičnim pelinom porijeklom iz Maroka s gorja srednjeg Atlasa. U narodnoj se medicini koristila za liječenje gastrointestinalnih bolesti. Također, biljka pokazuje patogenu učinkovitost te se stoga koristila kao lijek protiv bjesnoće. Biljka je bogata flavonoidima i fenolnim spojevima. (26)

### 1.1.10 *Artemisia arborescens* L.

*Artemisia arborescens* L. poznata i kao drvo pelina, uspravni je zimzeleni grm koji raste na području Mediterana do 1 m visine. Odlikuju je srebrno bijeli listovi i žuti cvjetovi. Raste u



ekstremnim uvjetima, tj. otporna je na nepovoljne uvjete kao što su vrućina, hladnoća, vjetar, mraz, slani zrak. Uzgaja se u svrhu dobivanja eteričnog ulja koje se koristi u parfemima i sapunima, također se može pripremiti kao ljekoviti čaj za smirivanje probavnih tegoba. (27)



Slika 14. *Artemisia arborescens* L. (28)

## 1.2 Eterična ulja

Eterična ulja, zbog svojih osobina oduvijek imaju poseban status među biljnim ekstraktima. S obzirom na činjenicu da se iz vrlo velikih količina biljnog materijala dobije tek vrlo malo eteričnog ulja, eterična ulja još se nazivaju „kraljevski“ ekstrakti biljaka. Većina eteričnih ulja su slabo viskozne tekućine na sobnoj temperaturi, te im je gustoća manja od gustoće vode, iako postoje i izuzetci. Glavna osobina eteričnih ulja je hlapljivost njegovih molekula. Sva eterična ulja su lipofilne molekule, što znači da vole „masna“, nepolarna otapala, a ne vole polarna otapala kao što je voda. Iz tog razloga, eterična ulja nisu topiva u vodi, ali dobro se otapaju u biljnim uljima i voskovima, koncentriranom etanolu, dietil-eteru i sličnim otapalima. Komponente eteričnih ulja građene od ugljikovih molekula 10 - 15 C-atoma, uglavnom su niske molekulske mase. Zbog svoje visoke lipofilnosti i niske molekulske mase lako se apsorbiraju kroz kožu, ali i općenito kroz stanične membrane što uključuje i laganu apsorpciju u probavnom sustavu. Također, visoka hlapljivost eteričnih ulja omogućuje laku inhalaciju, te su iz tog razloga stoljećima bili jedini lijek koji se primjenjivao na takav način. (29)

Sva eterična ulja moraju biti botanički i kemijski definirana. Botanički definirana znači da za određeno eterično ulje mora biti točno označena vrsta, podvrsta, varijetet i forma, jer botaničke karakteristike igraju veliku ulogu u kemijskom sastavu ulja. Kemijski definirano ulje ima točno definirani udio pojedinih molekula u eteričnom ulju, uobičajeno izražen u postotcima (%). Kemijskom analizom može se točno definirati i kemotip, pojava kada botanički isti materijal ovisno o mjestu rasta može dati eterična ulja različitog sastava, kao što



je slučaj kod timijana, ružmarina i još mnogih drugih eteričnih ulja. Eteričnim uljima smiju se nazivati samo oni ekstrakti koji su dobiveni:

1. destilacijom vodenom parom (većina eteričnih ulja)
2. tiještenjem (ulja usplođa citrusa)
3. direktnim zagrijavanjem biljnog materijala bez destilacije vodenom parom (iznimno rijetko, ulje kore cimetovca)

Svi drugi mirisni ekstrakti dobiveni na drugačiji način ne smiju se nazivati eteričnim uljima, već se nazivaju se prema načinu dobivanja, primjerice n-heksanski ekstrakt ili ekstrakt dobiven ugljikovim dioksidom pri super kritičnim uvjetima. Također, sintetske smjese ili mješavine sintetskih mirisa s prirodnim eteričnim uljima ne smiju se nazivati eteričnim uljima, već samo mirisima. (29)

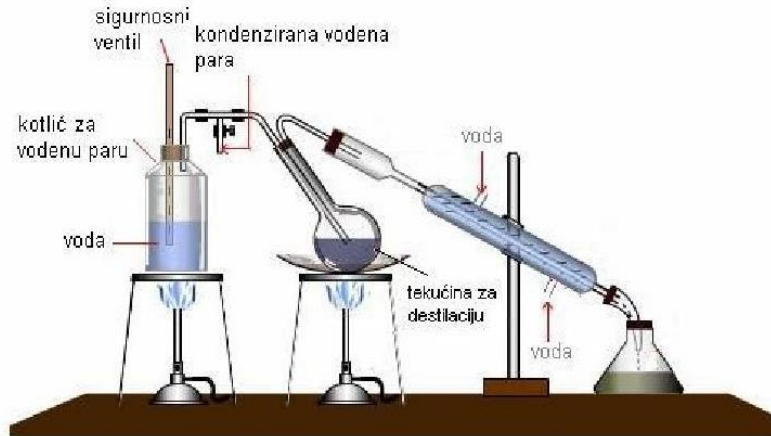
### **1.2.1 Dobivanje eteričnih ulja**

Za dobivanje eteričnih ulja može se upotrebljavati cijela biljka u cvatu ili različiti dijelovi biljke kao što su cvjetovi, laticice, usplođa, plodovi, sjeme, listovi itd. Ponekad se iz iste vrste biljke mogu dobiti različita eterična ulja, ovisno o dijelu biljke koji se podvrgava destilaciji ili o načinu dobivanja ulja. (30)

Većina eteričnih ulja dobiva se destilacijom vodenom parom ili tiještenjem, dok se vrlo mali broj ulja dobiva direktnim zagrijavanjem biljnog materijala. (31)

#### **1.2.1.1 Destilacija vodenom parom**

Većine komponenti eteričnih ulja imaju temperaturu vrelišta između 100 °C – 250 °C . Proces dobivanja eteričnog ulja destilacijom vodenom parom omogućuje vrenje sastavnica eteričnog ulja na nižim temperatura što smanjuje njihovu oksidaciju. Vodena para povećava ukupni tlak u destilacijskom sustavu koji omogućuje da zajedno s njom destiliraju tvari koje imaju vrelište više od 100 °C. (32)



**Slika 15.** Aparatura za destilaciju (32)

Iznad sloja vode koja ključa nalazi se mrežica s biljnim materijalom, što onemogućuje da voda dotiče biljni materijal, već samo vodena para prolazi kroz njega. Najučinkovitiji način proizvodnje eteričnih ulja je parna destilacija - hidrodestilacija tijekom koje se usitnjeni biljni materijal nalazi u kotlu na rešetki odignutoj od dna, a vodena para dolazi iz generatora pare smještenog izvan kotla i prolazi kroz biljnu masu. Izdvojenost generatora pare od kotla omogućuje kontrolu količine i temperature vodene pare koja je iznad 100 °C. Parnom destilacijom termička razgradnja eteričnih ulja svedena je na minimum. Ovaj način destilacije najviše se primjenjuje pri izolaciji eteričnih ulja. (33)

Prilikom destilacije potrebno je paziti na mekoću vode, temperaturu vodene pare, vrijeme trajanja destilacije, tlak, ali i pripremu biljnog materijala.

### 1.2.1.2 Tiještenje

Tiještenje je postupak kojim se dobivaju eterična ulja iz usplođa („kore“) citrusa. U ovom procesu se biljka ili dio biljke buši sitnim iglama ili preša da se oslobodi sadržaj iz žlijezda. Materijal se miješa s vodom, a ulje se odvaja od ostatka biljne mase najčešće centrifugiranjem. Ovakav način dobivanja eteričnog ulja primjenjuje se za usplođa plodova roda *Citrus*, kod kojih su žlijezde smještene na površini kore. Tako dobiveno eterično ulje sastoji se od hlapljive i nehlapljive frakcije. Hlapljiva frakcija (dominantna) sadrži spojeve kao što su esteri, monoterpeni i aldehidi, dok nehlapljiva frakcija sadrži flavonoide, neke furanokumarine, masne kiseline, di-, tri-, i tetraterpene. (33)

## 1.2.2 Sastavnice eteričnog ulja

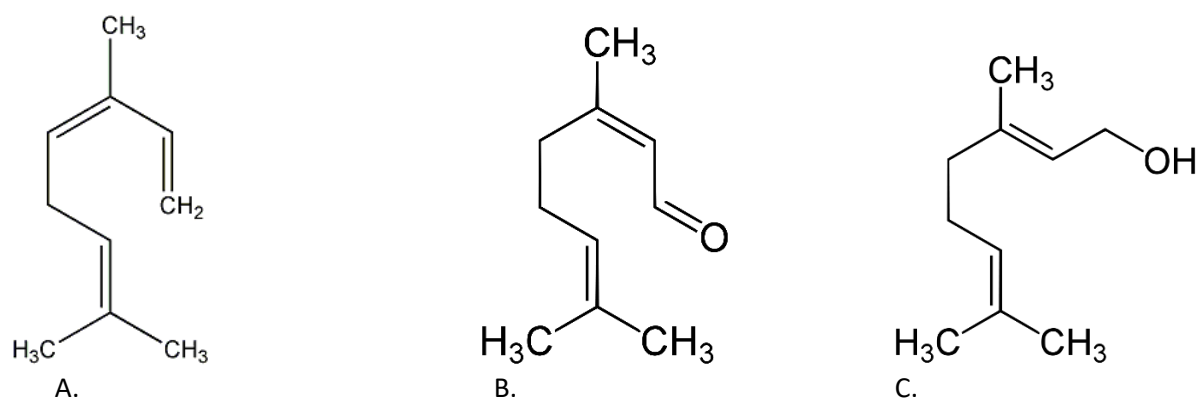
Eterična ulja vrlo su složene smjese velikog broja različitih kemijskih spojeva. Više od 500 spojeva ulazi u sastav eteričnih ulja, dok neka ulja mogu sadržavati i više od 60 različitih spojeva. Eterična ulja karakteriziraju 2-3 glavne komponente visokih koncentracija 20 % - 70 %, dok se ostali spojevi nalaze u tragovima. Upravo te glavne komponente određuju biološka svojstva eteričnog ulja. Kemijski spojevi koji ulaze u sastav eteričnih ulja pripadaju različitim grupama organskih spojeva kao što su ugljikovodici, alkoholi, fenoli, aldehidi, karboksilne kiseline, esteri, eteri i dr. Međutim, sastojci eteričnih ulja najčešće se dijele na tri velike skupine: terpene, fenilpropanske derivate i ostale spojeve. (34, 35)

### 1.2.2.1 Terpeni

Prema definiciji, terpeni su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici ugodna mirisa. Pripadaju skupini jednostavnih lipida. Sastoje se od izoprenskih jedinica,  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ . Monoterpeni sadrže dvije izoprenske jedinice, seskviterpeni tri, diterpeni četiri, itd. Također, u skupinu terpena ubrajaju se i viši polimer te od terpena izvedeni spojevi koji sadrže kisik, terpenoidi. Terpeni su sastavnice mnogih eteričnih ulja. Znanstveno su i tehnički vrlo važni jer su karakteristični proizvodi životnih procesa i sastojci većine prirodnih i umjetnih mirisnih tvari. (34)

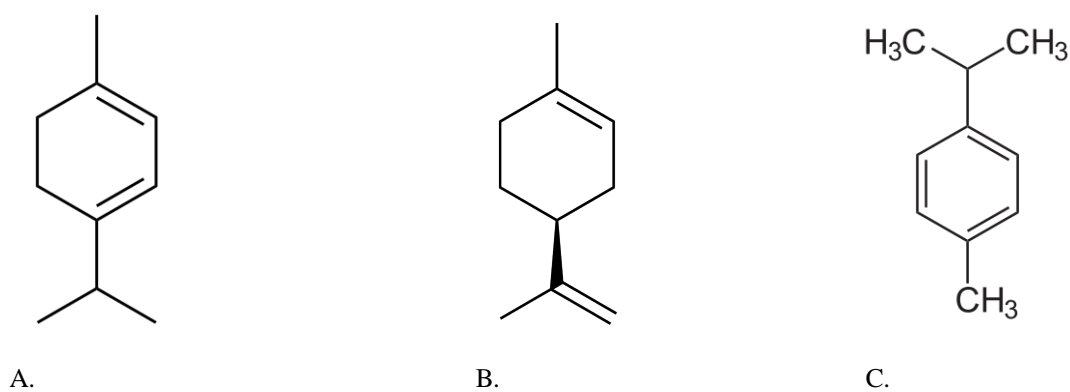
Prema broju ugljikovih atoma terpeni se dijele na semiterpene ( $\text{C}_5$ ), monoterpene ( $\text{C}_{10}$ ), seskviterpene ( $\text{C}_{15}$ ), diterpene ( $\text{C}_{20}$ ), triterpene ( $\text{C}_{30}$ ), tetraterpene ( $\text{C}_{40}$ ) i politerpene, dok u sastav eteričnog ulja ulaze monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni i triterpeni. (34)

Aciklični monoterpeni:



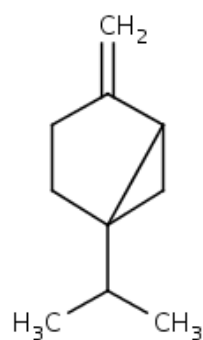
Slika 16. A-ocimen, B-citral, C-geraniol (34)

Monociklični monoterpeni:

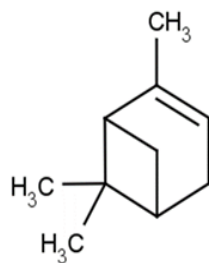


Slika 17. A.  $\alpha$ -terpinen, B. limonen, C. p-cimen (34)

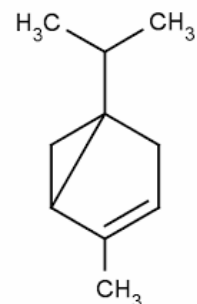
Biciklični monoterpeni:



A.



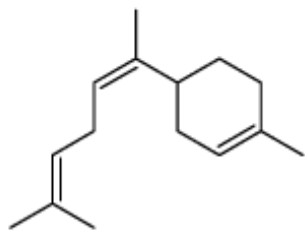
B.



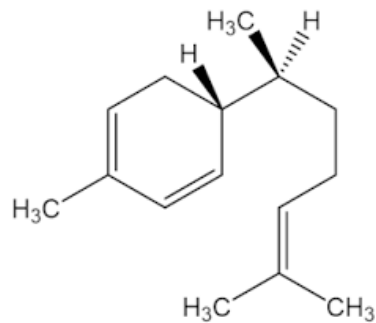
C.

**Slika 18.** A. Sabinen, B.  $\alpha$ -tujen, C.  $\alpha$ -pinen (34)

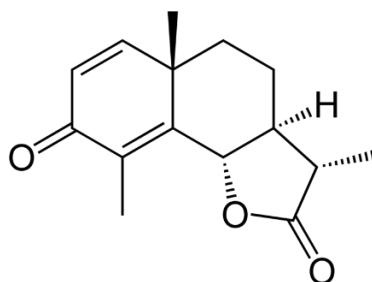
Seskviterpeni:



**Slika 19.** Bisabolen



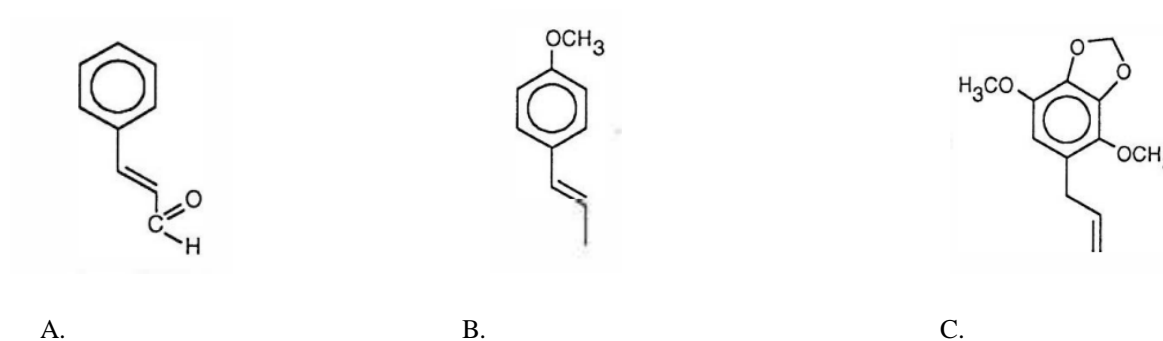
**Slika 20.** Zingiberen



**Slika 21.** Santonin (34)

### 1.2.2.2 Fenilpropani

Fenilpropanski derivati prirodni su spojevi C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> strukture ugljikovodika. Mogu biti aldehidi, fenoli i fenileteri koji se odvođe od cimetine kiseline. Na slikama ispod prikazani su neki od spojeva koji pripadaju skupini fenilpropana. (34)



Slika 22. A. Cimetaldhid, B. anetol, C. apiol (34)

### 1.2.2.3 Ostali spojevi

Lančasti ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom ubrajaju se u ostale spojeve eteričnog ulja. Viši ugljikovodici s 15-30 C-atoma, slični parafinu nazivaju se stearopteni, te su nakon duljeg uskladištenja sklorni procesu kristalizacije. U ovu skupinu treba ubrojiti i spojeve s dušikom i sumporom, koji su prisutni tek u malom broju ulja. (34)

## 1.2.3 Glavne komponente eteričnog ulja vrsta *Artemisiae*

Jak i aromatičan miris nekih vrsta roda *Artemisiae* uglavnom je posljedica visoke koncentracije hlapljivih terpena u njihovim eteričnim uljima. Međutim, na kvalitetu i prinos eteričnih ulja roda *Artemisiae* također utječe i sezona berbe, gnojivo, pH tla, uvjeti sušenja, geografski položaj, kemotip ili podvrsta, te dio biljke od kojeg je dobiveno eterično ulje. (35)

U tablici 1. prikazane su glavne komponente eteričnih ulja nekih vrsta *Artemisiae* u različitim zemljama porijekla. Različite koncentracije istog spoja i iste vrste, ali različitog porijekla pokazuju utjecaj geografskog položaja. (35)

**Tablica 1.** Glavne komponente eteričnog ulja (>10%) nekih vrsta *Artemisiae*

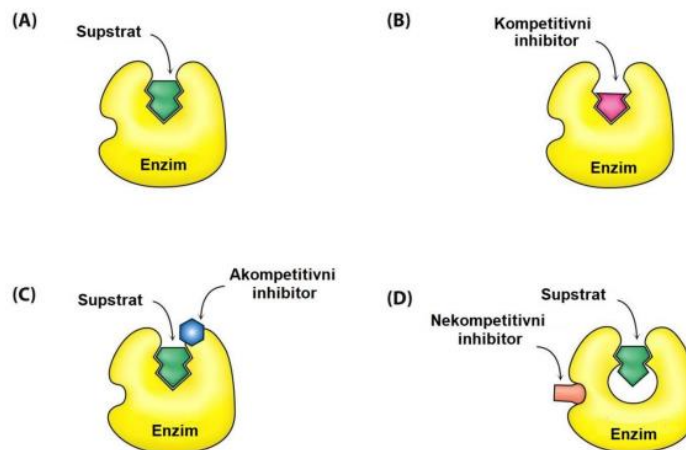
<b>Kemijski spoj</b>	<b>Vrsta Artemisie</b>	<b>Zemlja porijekla</b>	<b>Količina (%)</b>	<b>Ref.</b>
<b>trans-anetol</b>	<i>A. dracunculus</i>	Iran	21,1	(36)
	<i>A. dracunculus</i>	Turska	81,0	(37,38)
<b>artemisia ketone</b>	<i>A. annua</i>	Egipat	14,0	(39)
<b>kamfor</b>	<i>A. absinthium</i>	Etiopija	3,7	(40)
	<i>A. annua</i>	Litva	42,6	(41)
	<i>A. annua</i>	Etiopija	9,6	(40)
<b>limonen</b>	<i>A. dracunculus</i>	Iran	12,4	(36)
<b>linalol</b>	<i>A. annua</i>	Indija	11,9	(41)
<b>trans-ocimene</b>	<i>A. dracunculus</i>	Iran	20,6	(36)
<b><math>\beta</math>-pinene</b>	<i>A. absinthium</i>	Iran	23,8	(42)
<b><math>\beta</math>-thujone</b>	<i>A. absinthium</i>	Iran	18,6	(42)
	<i>A. absinthium</i>	Kanada	10,1	(43)

### 1.3 Inhibicija enzima

Inhibicija enzimske aktivnosti glavni je kontrolni mehanizam u biološkim sustavima. Aktivnost mnogih enzima inhibira se vezanjem malih molekula i iona. Isto tako, mnogi lijekovi i otrovi djeluju kao inhibitori enzima. (44)

Inhibicija enzima može biti reverzibilna i ireverzibilna. Ireverzibilni inhibitor vrlo sporo disocira s ciljnog enzima iz razloga što je vrlo čvrsto kovalentno ili nekovalentno vezan na enzim. Pojedini ireverzibilni inhibitori poput penicilina koji djeluje tako da kovalentno modificira enzim transpeptidazu, čime sprječava sintezu stanične stijenke bakterija i aspirina koji djeluje tako da mijenja enzim ciklooksigenazu, čime se smanjuje sinteza signalnih molekula u upalnom procesu, lijekovi su od iznimne važnosti. S druge strane, reverzibilnu inhibiciju karakterizira brza disocijacija kompleksa enzim-inhibitor. S obzirom na način vezanja reverzibilnog inhibitora razlikuju se: kompetitivni inhibitor veže se na aktivno mjesto

i sprječava vezanje supstrata, akompetitivni inhibitor veže se samo na kompleks enzim-supstrat i nekompetitivni inhibitor ne sprječava vezanje supstrata. (44)



Slika 23. Reverzibilni inhibitori (44)

Kod kompetitivne inhibicije inhibitor često nalikuje na supstrat i veže se na aktivno mjesto enzima i samim time sprječava vezanje supstrata na isto aktivno mjesto. Kompetitivni inhibitor smanjuje brzinu katalize smanjujući broj molekula enzima koje vežu supstrat. Pri bilo kojoj koncentraciji inhibitora, kompetitivna se inhibicija može ublažiti povećanjem koncentracije supstrata. Pod tim uvjetima za aktivno mjesto natječe se supstrat s inhibitorom. Metotreksat koji se upotrebljava u liječenju karcinoma, iznimno je snažan kompetitivni inhibitor enzima dihidrofolat-reduktaze, iz razloga što se na enzim veže tisuću puta snažnije od prirodnih supstrata. (44)

Akompetitivna inhibicija ne može se nadvladati povećanjem koncentracije supstrata, dok se inhibitor veže samo na kompleks enzim-supstrat.

Kod nekompetitivne inhibicije, inhibitor i supstrat mogu se istodobno vezati na različita vezna mjesta. Inhibitor djeluje tako da smanjuje broj molekula enzima koje mogu vezati supstrat. Poput akompetitivne inhibicije, ni nekompetitivna inhibicija ne može se nadvladati povećanjem koncentracije supstrata. (44)

Reverzibilni se pak inhibitori mogu razlikovati i na temelju kinetike. Tipovi inhibicije mogu se odrediti mjerenjem brzina katalize pri različitim koncentracijama enzima i inhibitora. Kao

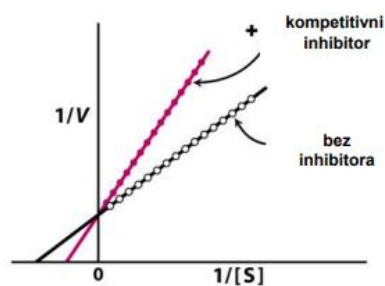


što je već ranije spomenuto pri kompetitivnoj inhibiciji inhibitor se natječe sa supstratom za aktivno mjesto. Konstanta disocijacije za inhibitor definira se kao:

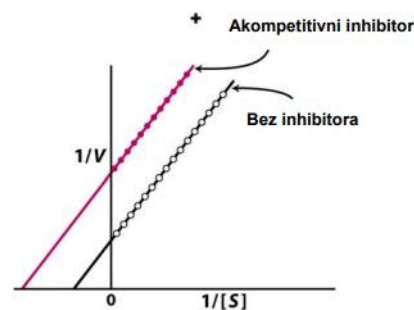
$$K_i = [E][I] / [EI]$$

Inhibitor je to jači što je  $K_i$  manji. S obzirom da je glavna značajka kompetitivne inhibicije da se može nadvladati velikom koncentracijom supstrata, pri dovoljno velikoj koncentraciji sva su aktivna mjesta popunjena supstratom i enzim je posve djelatan. Kompetitivni se inhibitori često koriste kao lijekovi. Ibuprofen i njemu slični lijekovi inhibiraju enzime koji sudjeluju u upalnim procesima, te statini koji smanjuju koncentraciju kolesterola u krvi, djelujući kao kompetitivni inhibitori ključnog enzima u biosintezi kolesterola. Kod akompetitivne inhibicije, inhibitor se veže isključivo na kompleks ES. Herbicid glikofosfat, akompetitivni je inhibitor enzima na biosintetskom putu aromatskih aminokiselina. Deoksiciklin antibiotik koji služi za liječenje zubnog mesa djeluje kao nekompetitivni inhibitor proteolitičkog enzima kolagenaze. (44)

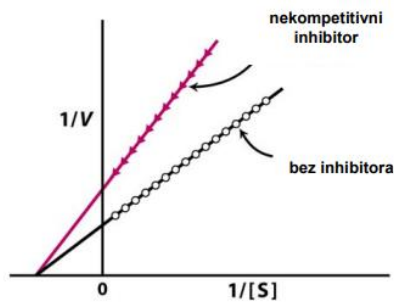
Za razlikovanje kompetitivnih, akompetitivnih i nekompetitivnih inhibitora osobito su korisni dvostruko-recipročni dijagrami. (44)



Slika 24. A. Kompetitivna inhibicija



B. Akompetitivna inhibicija



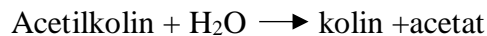
C. Nekompetitivna inhibicija (44)

### 1.3.1 Enzimi inhibirani od strane eteričnih ulja *Artemisiae*

#### 1.3.1.1 AChE i BChE

##### AChE

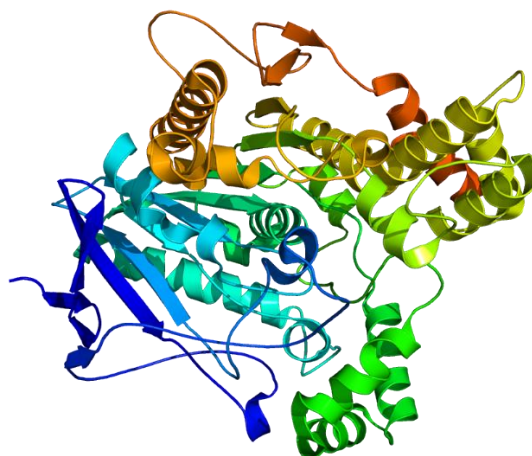
Acetilkinesteraza također poznata i kao AChE, primarna je kolinesteraza u tijelu. To je enzim koji katalizira razgradnju acetilkolina i nekih drugih kolinskih estera koji djeluju kao neuroprijenosnici. (45)



AChE su smještene u neuromišićnoj spojnici i kolinergičkim sinapsama u mozgu, gdje prvenstveno funkcioniraju u finalizaciji sinapsne neurotransmisije. Imaju veoma izraženu katalitičku aktivnost, jer svaka molekula acetilkolinesteraze razgrađuje oko 25.000 molekula acetilkolina u sekundi (ACh). (45)

##### BChE

Butirilkolinesteraza, također poznata kao BChE, BuChE, pseudokolinesteraza ili esteraza plazme, je nespecifični enzim kolinesteraze koji hidrolizira mnoštvo različitih estera na bazi kolina. U ljudi se stvara u jetri, a nalazi se uglavnom u krvnoj plazmi. Vrlo je sličan neuronskoj acetilkolinesterazi, koja je također poznata kao eritrocitna kolinesteraza. Izraz "serumska kolinesteraza" općenito se odnosi na klinički test koji odražava razine obaju ovih enzima u krvi. (46)

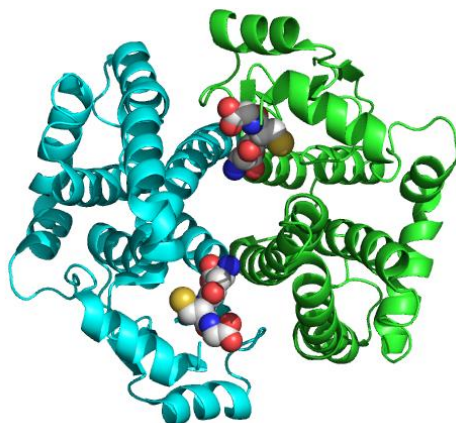


**Slika 25.** Kolinesteraze (47)

AChE i BChE inhibitori mogu biti reverzibilni i ireverzibilni. Ireverzibilni inhibitori AChE, kao što su organofosfatni spojevi (malation, sarin, soman) mogu izazvati paralizu mišića, konvulzije i bronhokonstrikcije. Također u ireverzibilne inhibitore ubrajaju se i karbamati. Reverzibilni inhibitori AChE i BChE poput rivastigmina, donepezila i galantamina koriste se u liječenju neurokognitivnih disfunkcija kod Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti kao i u liječenju drugih oblika demencije. Takrin je centralni inhibitor acetilkolinesteraze. (45,46)

### **1.3.1.2 Glutation-S-transferaza**

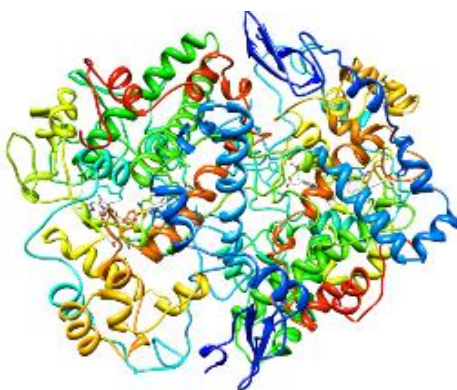
Glutation-S-transferaze (GST) su raznolika skupina enzima faze II koji metaboliziraju lijekove čija je zajednička funkcija konjugacija glutationa (GSH) na razne elektrofilne endobiotike i ksenobiotike. GST su uključeni u konjugaciju endogeno proizvedenih oksidiranih metabolita uključujući propenal, 4-hidroksinonenal, organski hidroperoksidi, fosfolipidi i peroksidi masnih kiselina. Ovi enzimi dijele se na membranski vezane mikrosomalne, mitohondrijske i citoplazmatske. Glutation S-transferaza postala je glavna meta u svrhu liječenja velikog broja tumora, također igra ulogu i u etiologiji drugih bolesti, uključujući neurodegenerativne bolesti, multiplusklerozu i astmu. (48)



**Slika 26.** Glutation-*S*-transferaza (49)

### 1.3.1.3 Ciklooksigenaza

Ciklooksigenaza (COX) je važan enzim u stvaranju upalnog odgovora. Sudjeluje u pretvorbi arahidonske kiseline u prostaglandine, kemijske spojeve koji imaju središnju ulogu u upalnom procesu i pojačanoj osjetljivosti perifernih živčanih završetaka odgovornih za osjet boli. Postoje dva oblika ciklooksigenaze: konstitutivna COX-1 i inducibilna COX -2. Ciklooksigenaza je glavno mjesto djelovanja nesteroidnih antireumatika koji blokiraju njihovo djelovanje. Terapijski učinak nesteroidnih antireumatika se postiže prvenstveno djelovanjem na COX-2. (50)



**Slika 27.** COX-2 u kompleksu sa selektivnim inhibitorom (50)

#### 1.3.1.4 Angiotenzin konvertirajući enzim

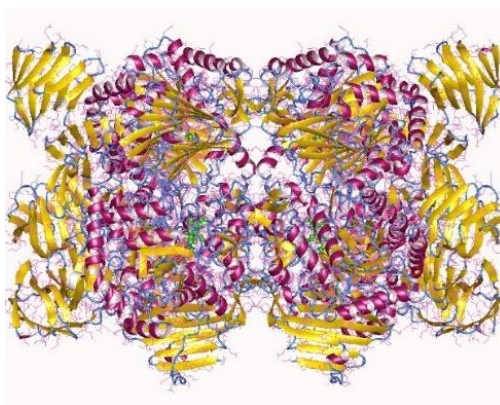
Enzim koji pretvara angiotenzin ili ACE, središnja je komponenta sustava renin-angiotenzin, koji kontrolira krvni tlak reguliranjem volumena tekućine u tijelu. Kako mu samo ime kaže, angiotenzin konvertirajući enzim pretvara hormon angiotenzin I u aktivni vazokonstriktor angiotenzin II. Stoga ACE neizravno povećava krvni tlak uzrokujući sužavanje krvnih žila. Inhibicija ovog enzima ključna je u liječenju hipertenzije. (51)

#### 1.3.1.5 Tirozinaza

Tirozinaza, enzim koji pripada skupini monofenol - monooksigenaza, katalizira oksidaciju fenola, a nalazi se u biljnim i životinjskim organizmima. Pomaže pri sintezi melanina i nekih drugih pigmenta. Mutirani gen za tirozinazu uzrokuje albinizam, dok povišene koncentracije tirozinaze u tijelu mogu uzrokovati melanom. (52)

#### 1.3.1.6 $\alpha$ -glukozidaza

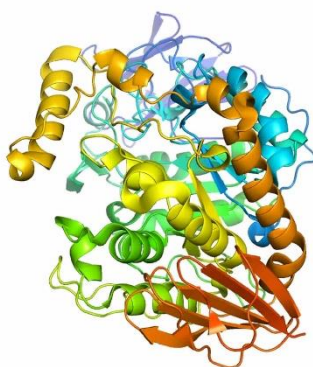
$\alpha$ -Glukozidaze su egzoenzimi koji hidroliziraju terminalne glikozidne veze i oslobađaju  $\alpha$ -glukozu s nereducirajućeg kraja lanca supstrata. Široko su rasprostranjeni u biljnom i životinjskom tkivu, ali i u mikroorganizmima.  $\alpha$ -Glukozidaze mogu hidrolizirati sintetske  $\alpha$ -glikozide i oligosaharide koji sadrže  $\alpha$ -glukozidne veze kao i  $\alpha$ -glukane. (53) Inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze oralni su lijekovi protiv dijabetesa koji se koriste za dijabetes *mellitus* tipa 2. Ugljikohidrati se normalno pretvaraju u jednostavne šećere (monosaharide) pomoću enzima  $\alpha$ -glukozidaze prisutnih u crijevnim stanicama, omogućujući monosaharidima da se apsorbiraju kroz crijeva. Stoga glavna zadaća inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze je smanjen utjecaj ugljikohidrata iz hrane na šećer u krvi. Jedan od najpoznatijih inhibitora ovog enzima je akarboza koja se koristi u liječenju hiperglikemije. (54)



**Slika 28.**  $\alpha$ -glukozidaza (55)

### 1.3.1.7 $\alpha$ -amilaza

$\alpha$ -Amilaza je enzim koji katalizira hidrolizu škroba u šećeru. Tako iz amilopektina, amiloze, glikogena i njihovih hidroliziranih produkata nastaju jednostavniji šećeri, disaharidi i trisaharidi. Općenito, amilaze nastaju u acinusnim stanicama gušterače i žlijezda slinovnica te se potom luče u probavni sustav gdje razgrađuju složene spojeve u jednostavne kako bi se mogle apsorbirati iz probavnog sustava u krvotok. Inhibitori  $\alpha$ -amilaze mogu djelovati kao blokatori, ograničavajući probavljivost i apsorpciju ugljikohidrata u gastrointestinalnoj prehrani. Inhibitori ovog enzima mogu se koristiti za prevenciju bolesti kao što su dijabetes, hiperglikemija, hiperlipemija i pretilost. (56)



**Slika 29.**  $\alpha$ -amilaza (57)

### 1.3.1.8 Alkalna fosfataza

Alkalne fosfataze su specifični enzimi koji kataliziraju hidrolizu monoestera fosfatne kiseline i alkohola. Optimalan pH za djelovanje enzima je između 9.8 i 10.5, a ovisi o vrsti supstrata i vrsti pufera. Enzim je prisutan najviše u epitelu tankog crijeva, bubrežnim tubulima, kostima,

jetri, placenti i leukocitima. U raznim bolestima koje zahvaćaju navedene organe dolazi do porasta katalitičke koncentracije alkalne fosfataze (ALP) u serumu. Inhibicija alkalne fosfataze ključna je u prevenciji i liječenju bolesti jetre i žući, te kod bolesti kostiju. (58)

#### **1.3.1.9 Aspartat - aminotransferaza i alanin - aminotransferaza**

Aspartat - aminotransferaza (AST) je enzim transaminaza koji katalizira pretvorbu aspartata i  $\alpha$ -ketoglutarata u oksaloacetat i glutamat. Enzim AST prisutan je u svim tkivima osim kostiju, a najviše ga se nalazi u jetri i skeletnim mišićima. Do povišenih koncentracija ovog enzima dolazi nakon modrice, traume, nekroze, infekcije ili neoplazije jetre ili mišića. (59) Alanin - transaminaza (ALT), također poznata i kao alanin - aminotransferaza, enzim je koji se uglavnom nalazi jetri. U stanju oštećene jetre dolazi do povećanja razine alanin - transaminaze, iz tog razloga inhibicija ovih enzima koristi se u liječenju bolesti jetre. (60)

## 2 EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1 Metode određivanja inhibicijske sposobnosti

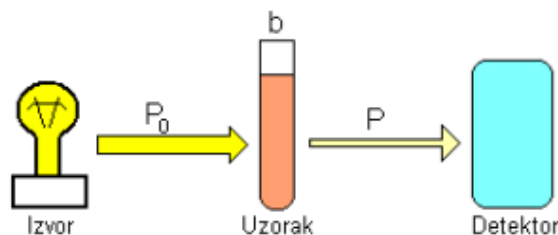
#### 2.1.1 Test inhibicije enzima tirozinaze

Najčešće korištena tehnika pri određivanju inhibicijske sposobnosti tirozinaza je spektrofotometrija. Spektrofotometrija je tehnika kojom se mjeri apsorpcija emitiranog elektromagnetskog zračenja nakon što se određeni uzorak podvrgne zračenju. Apsorpcijske značajke pojedine vrste uglavnom su opisane apsorpcijskim spektrom. To je grafički prikaz neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, frekvencije ili valnog broja. Vertikalna os takvih prikaza može biti propusnost (transmitacija) izražena u postotcima ili apsorbancija.

Transmitacija  $T$  otopine definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Gdje je  $P_0$  ulazna snaga snopa svjetlosti, a  $P$  snaga snopa svjetlosti nakon apsorpcije.



**Slika 30.** Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini (61)

Na slici 30. prikazan je snop paralelnog zračenja prije i nakon prolaza kroz sloj otopine debljine  $b$  (cm) i koncentracije  $c$  vrste koja apsorbira. Posljedica međudjelovanja fotona i čestice koje apsorbiraju je smanjenje snage snopa s  $P_0$  na  $P$ .



Apsorbancija  $A$  otopine definira se jednadžbom:

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P}$$

Nasuprot transmitaciji, apsorbcija otopine povećava se s prigušenjem osnovnog snopa.

Funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom i one veličine koja se određuje (koncentracija  $c$ ) poznat je kao Beerov zakon:

$$A = \log \left( \frac{P_0}{P} \right) = a \times b \times c$$

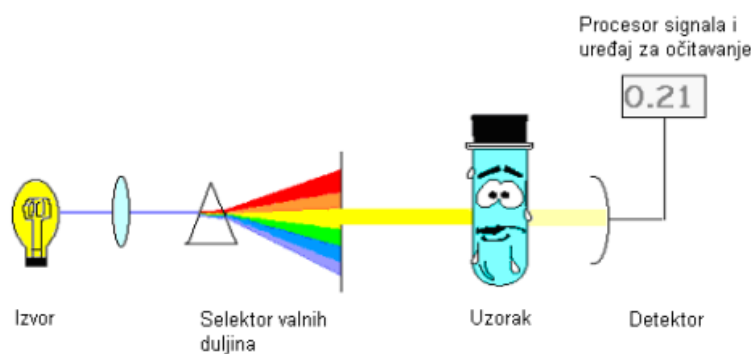
Gdje je  $a$  konstanta proporcionalnosti, apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent),  $b$  duljina puta zračenja kroz uzorak, a  $c$  je koncentracija apsorbirajuće vrste. Budući da je apsorbcija veličina bez dimenzija, jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju se uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska. Kada se  $c$  u prethodnoj jednadžbi izražava u molovima po litri, a  $b$  u centimetrima, konstanta proporcionalnosti naziva se molarnom apsorptivnošću (molarnim apsorpcijskim koeficijentom) s uobičajenim simbolom  $\epsilon$ . Tada je

$$A = \epsilon \times b \times c$$

gdje se  $\epsilon$  izražava u  $\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

Većina je spektroskopskih uređaja sastavljena od 5 osnovnih dijelova:

- stabilnog izvor zračenja
- selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja
- jednoga ili više spremnika za uzorke
- detektora zračenja ili pretvornika energije zračenja u mjerljiv signal
- procesora signala i uređaj za njegovo očitavanje (61)



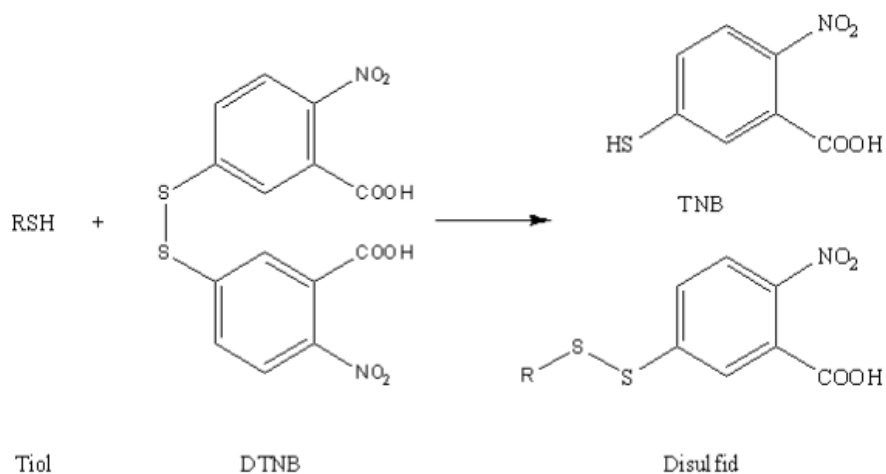
**Slika 31.** Dijelovi instrumenta za optičku spektroskopiju. (61)

Taherkhani i suradnici (62) određivali su inhibicijsku aktivnost tirozinaze pomoću spektrofotometrijska metoda koju su opisali Chan i suradnici. (63) Metoda se temelji na modificiranoj metodi dopakroma s L-DOPA kao supstratom. Alikvot od 5 mg eteričng ulja izvagan je i otopljen u 2 mL 50% DMSO. Tada je 40  $\mu$ L uzorka dodano u 80  $\mu$ L 0,1 M fosfatnog pufera (pH 6,8), 40  $\mu$ L 0,02 mg/mL tirozinaze i 40  $\mu$ L L-DOPA (2,5 mM) u jažice mikrolitarske ploče s 96 jažica. Uzorci su inkubirani 30 minuta na 37 °C. Za svaki uzorak napravljena je i slijepa proba koja je sadržavala sve komponente osim L-DOPA. Apsorpcija je mjerena na 475 nm i rezultati su uspoređeni s onima za kontrolu koja sadrži 50 % DMSO umjesto otopine uzorka. Kvercetin je korišten kao pozitivna kontrola. Postotak inhibicije tirozinaze izračunat je kao:

$$\text{Inhibicija tirozinaze (\%)} = ((A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}}) / A_{\text{kontrola}}) \times 100. \quad (62)$$

### 2.1.2 Test inhibicije enzima AChE i BChE

Sposobnost neke čiste tvari ili smjese da inhibira kolinesteraze, acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolin esterazu (BChE), najčešće se ispituje spektrofotometrijski, metodom po Ellmanu. Enzimska aktivnost mjeri se prateći povećanje koncentracije žutog obojenja nastalog tiokolina koji stupa u reakciju s tionitrobenzoat ionom (DTNB). Ellmanov reagens 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB) koristi se za određivanje koncentracije tiola u uzorku. Tioli reagiraju s DTNB-om i nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja potom u vodi ionizira u  $\text{TNB}^-$  ion kod neutralnog ili alkalnog pH. Količina oslobođenog  $\text{TNB}^-$  mjeri se pri apsorpciji od 412 nm. Oslobođeni  $\text{TNB}^-$  je intenzivno žute boje. (64)



**Slika 32.** Mehanizam reakcije Ellmanovog reagensa s tiolnom skupinom. (65)

U članku kojeg su objavili M. Shoaib i suradnici (66), AChE iz električne jegulje i BChE iz seruma konja korišteni su za ispitivanje inhibicije enzima djelovanjem eteričnog ulja koristeći Ellmanov test . Eterično ulje otopljeno je u nekoliko kapi DMSO i dalje razrijeđen u fosfatnom pufer (0,1 M) u različitim koncentracijama (125 µg/mL - 1000 µg/mL). AChE (518 U/mg) i BChE (7 U/mg - 16 U/mg) razrijeđeni su u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 8,0) do konačne koncentracije od 0,03 U/mL (AChE) i 0,01 U/mL (BChE). Otopine DTNB (0,2273 mM), ATchI (0,5 mM) i BTchI (0,5 mM) pripremljeni su u destiliranoj vodi i držani u eppendorfovima u hladnjaku na 8°C. Za svaki test, otopina enzima od 5 µL dodana je u kivetu, te su zatim dodani eterično ulje (205 µL) i DTNB reagens (5 µL). Smjesa je održavana na 30°C u vodenoj kupelji 15 min. Spektrofotometrom je izmjerena apsorbancija na 412 nm. Galantamin se koristio kao pozitivna kontrola. Apsorpcija i vrijeme reakcije mjereni su četiri minute na 30°C. Aktivnost enzima i inhibicija enzima izračunata je na sljedeći način:

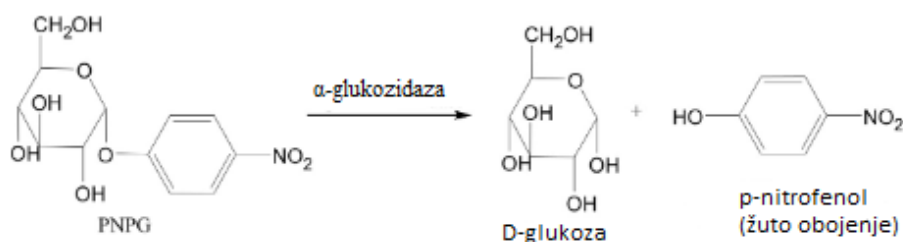
$$\text{Inhibicija enzima (\%)} = 100 - \% \text{ aktivnosti enzima}$$

$$\text{Aktivnost enzima (\%)} = 100 \times V/V_{\text{max}}$$

gdje je  $V_{\text{max}}$  aktivnost enzima u odsutnosti inhibitora. (66)

### 2.1.3 Test inhibicije $\alpha$ -glukozidaze

Spektrofotometrijska metoda koja se temelji na mjerenju promjene apsorbancije otopine, do koje dolazi uslijed reakcije enzima  $\alpha$ -glukozidaze i supstrata *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozida (pNPG) jedna je od najčešće korištenih metoda testiranja aktivnosti inhibitora. Produkti spomenute reakcije su D-glukoza i *p*-nitrofenol koji u lužnatom mediju poprima žuto obojenje. (67)



Slika 33. Mehanizam hidrolize pNPG pomoću  $\alpha$ -glukozidaze. (67)

Abdoul-Latif i suradnici (68) ispitivali su inhibicijsku sposobnost  $\alpha$ -glukozidaze slijedeći protokol Wua i suradnika (2021) (69). 50  $\mu$ L eteričnih ulja pripremljeni su u različitim koncentracijama (0,25, 0,5 i 1 mg/mL) i inkubirani s otopinom koja sadrži 10  $\mu$ L  $\alpha$ -glukozidaze (maltaze) 1 U/mL i 125  $\mu$ L 0,1 M fosfatnog pufera (pH 6,8) 20 min na 37°C. Da bi reakcija započela dodana je otopina od 20  $\mu$ L 1 M pNPG (4-nitrofenil- $\beta$ -d-glukopiranozid) te je zatim inkubiran pola sata. Za prekid reakcije dodano je 50  $\mu$ L 0,1 N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Apsorpcija je izmjerena na 405 nm pomoću spektrofotometra. Za ovu analizu, akarboza je korištena kao pozitivna kontrola (inhibitor  $\alpha$ -amilaze). Eksperimenti su ponovljeni tri puta za svaku koncentraciju. Inhibicijska aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze izračunata je korištenjem sljedeće formule:

$$I (\%) = \left( \frac{\text{ABS}_{\text{kontrola}} - \text{ABS}_{\text{uzorak}}}{\text{ABS}_{\text{kontrola}}} \right) \times 100$$

Nakon određivanja inhibicije  $\alpha$ -amilaze,  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti određene su za akarbozu i eterična ulja (potrebna koncentracija za inhibiciju 50 % od  $\alpha$ -amilaze). (68)

#### 2.1.4 Test inhibicije enzima $\alpha$ -amilaze

Najčešće korištena metoda ispitivanja inhibicijske aktivnosti  $\alpha$ -amilaze je Caraway–Somogyi jod / kalij jodid metoda. 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 IC<sub>50</sub>. (70)

### 3 REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu *in vitro* inhibicije enzima eteričnim uljima biljaka roda *Artemisia*. Brojna bolesna stanja u ljudi tretiraju se ili preveniraju na način da se enzimi ključni u procesima vezanim uz pojedina bolesna stanja inhibiraju. Primjerice inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze ili  $\alpha$ -glukozidaze koristi se u tretmanu dijabetesa, inhibicija enzima acetilkolin esteraze i butirilkolin esteraze koristi se u tretmanu Alzheimerove demencije, inhibicija enzima ksantin oksidaze ključna je u tretmanu gihta, i dr. Obzirom da se uz lijekove koji se koriste u tretmanima ovih i sličnih bolesti vezuju i određene nuspojave, znanstvena zajednica je u stalnoj potrazi za tvarima izoliranim iz prirode koji će pomoći u tretmanu pojedinih bolesnih.

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: essential oils, enzyme inhibition, *Artemisia*.

T. Taherkhani i suradnici 2014. godine objavili su članak pod nazivom „*Tyrosinase Inhibition, Super Oxide Anion and Nitric Oxide Radical Scavenging Properties of Artemisia absinthium Essential Oil*“. (62) Eterično ulje dobiveno vodenom destilacijom listova *Artemisie absinthium* L. prikupljenih na području sjeverozapadnog Irana, podvrgnuto je ispitivanju inhibicije enzima, fitokemijskih svojstava i svojstava hvatanja radikala. Listovi *Artemisie absinthium* L. ostavljeni su par dana da se suše na sobnoj temperaturi. Osušeni biljni materijal hidrodestiliran je u aparaturi po Clevengeru.



**Slika 34.** Aparatura po Clevengeru (71)

Nakon dekantiranja i sušenja ulja koristeći bezvodni natrijev sulfat, prinos eteričnog ulja iznosio je 1,01 % w/w. Inhibicija tirozinaze određivana je spektrofotometrijskom metodom koristeći modificiranu dopakrom metodu s L-DOPA kao supstratom. 5 mg alikvota ekstrakta izvagano je i otopljeno u 2 mL 50 % DMSO. Zatim je 40  $\mu$ L uzorka dodano u 80  $\mu$ L 0,1 M fosfatnog pufera (pH 6,8), 40  $\mu$ L 0,02 mg/mL tirozinaze i 40  $\mu$ L L-DOPA (2,5 mM) u jažicu. Uzorci su inkubirani 30 min na 37 °C. Apsorbancija je mjerena na 475 nm. Rezultati su uspoređeni s kontrolom koji sadrži 50 % DMSO umjesto uzorka. Kojična kiselina i kvercetin korišteni su kao pozitivne kontrole. Postotak inhibicije tirozinaze izračunat je kao:

$$\text{Inhibicija tirozinaze(\%)} = \left( \frac{A_{\text{kontrolna}} - A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{kontrolna}}} \right) \times 100$$

Nakon provedene analize kemijskog sastava eteričnog ulja *Artemisiae absinthium* L. dobiveni su rezultati prikazani u tablici 2. Najzastupljenije komponente eteričnog ulja *A. absinthium* L. bile su 1,8-cineol (36,46 %), borneol (25,99 %) i kamfor (10,20%). Anti-tirozinazna aktivnost eteričnog ulja *A. absinthium* L. izražena je u ekvivalentnim vrijednostima kvercetina.

Maksimalni postotak inhibicije tirozinaze bio je 42,06 % pri 3,58 g. Anti-tirozinazna aktivnost pri 50 %-tnoj koncentraciji (IC<sub>50</sub>) iznosila je 4,52 mg ( $y = 7,5607x + 15,802$ ; R<sup>2</sup> = 0,9874). (62)

**Tablica 2.** Antitirozinazna aktivnost eteričnog ulja *A. absinthium*. (62)

Eterično ulje (μg)*	0,714	1,78	2,85	3,58	IC <sub>50</sub> (μg)
Koncentracija u sustavu (mg/mL)	0,0714	0,178	0,285	0,358	
<b>Antitirozinazna aktivnost (%)</b>	20,26±4,62	30,56±1,68	37,77±4,64	42,06±0,39	4,52 (0,452 μg/mL)
<b>Ekvivalent kvercetina (mg)</b>	0,31	1,26	1,79	2,15	

U članku objavljenom 2015. u Bangladeshu od strane M. Shoaib i suradnika ispitivana je inhibicija AChE i BChE djelovanjem eteričnog ulja *Artemisia macrocephalae* L. (66) Biljni materijal prikupljen je u kolovozu 2009. u Pakistanu. Svježe grančice *A. macrocephalae* L. bile su podvrgnute hidroestilaciji u aparaturi po Clevengeru. Nakon 6 sati, dobiveno je eterično ulje žute boje i karakterističnog mirisa. Ulje je pohranjeno u hermetički zatvorenim spremnicima prije daljnje analize. Za određivanje kemijskog sastava korištena je plinska kromatografija i masena spektrometrija (engl. *Gas chromatography GC, mass spectrometry MS*). Rezultati kombinacije ovih dvaju tehnika pokazali su da  $\alpha$ -tujon (56,2 %), 3-tujanon (11,7 %) i cineol (10, 8 %) čine glavninu sastava ovog eteričnog ulja. Znatno manji udio imali su terpinen-4-ol (5,5 %), alkanfor (3,9 %), sabinen (3,8 %) i *o*-cimen (2,4 %). Za određivanje inhibicijskog potencijala eteričnog ulja na enzime AChE i BChE korištena je Ellmanova metoda. Uzorak ulja pokazao je 87,7 ± 1,2, 77,9 ± 0,6, 74,5 ± 1,9 i 62,5 ± 0,3 % inhibicije AChE pri koncentraciji od 1000, 500, 250 i 125 μg/mL s IC<sub>50</sub> vrijednošću od 40 μg/mL. Slično je bilo i inhibitorno djelovanje eteričnog ulja *A. macrocephalae* L. na BChE (81,8 ± 0,6, 75,6 ± 1,2, 70,0 ± 0,6 i 64,2 ± 1,4 % pri koncentracijama od 1000, 500, 250 i 125 μg/mL) s IC<sub>50</sub> vrijednošću od 30 μg/mL. Rezultati ovog istraživanja samo su potvrda već korisne primjene eteričnog ulja *Artemisiae macrocephalae* L. u liječenju raznih neurodegenerativnih poremećaja kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, ataksija i razni drugi oblici demencije. (66)

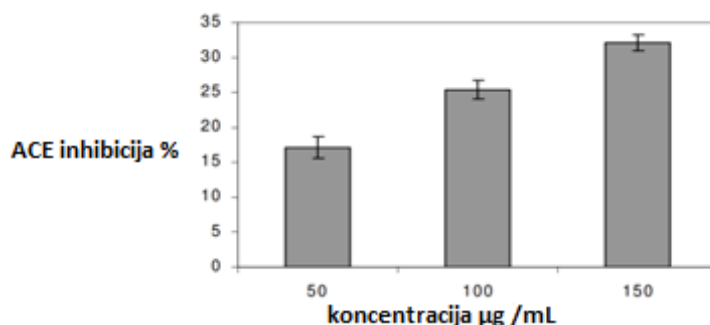


U veljači 2022. N. Jaradat i suradnici objavljuju članak pod nazivom „*Assessing Artemisia arborescens essential oil compositions, antimicrobial, cytotoxic, anti-inflammatory, and neuroprotective effects gathered from two geographic locations in Palestine*“. (72) Biljni materijal potreban za ovo istraživanje prikupljen je u srpnju 2020. godine, na dvama različitim geografskim područjima u Palestini, u Betlehemu i Jeninu, te je zatim opran i osušen na sobnoj temperaturi. Za dobivanje eteričnog ulja *A. arborescens* L. korištena je metoda hidrodestilacije. Uzorci eteričnih ulja iz različitih regija Palestine podvrgnuti su kemijskoj analizi sastava putem GC-MS sustava.  $\beta$ -tujon (89,64 %), kamfor (5,34 %) i  $\beta$ -pinen (2,01 %) bile su glavne komponente u uzorku eteričnog ulja dobivenog od biljnog materijala prikupljenog u Betlehemu, dok su  $\beta$ -tujon (79,16 %), kamfor (6,58 %) i sabinen (3,44 %) bile dominantne komponente u uzorku eteričnog ulja dobivenog od biljnog materijala prikupljenog u Jeninu. Izračuni  $IC_{50}$  vrijednosti ovih potencijalnih inhibitora ciklooksigenaze (engl. *Cyclooxygenase*, COX) pokazali su da eterično ulje *A. arborescens* L. iz Jenina ima visoko inhibicijsko djelovanje na COX-1 ( $IC_{50} = 1,8 \pm 0,75 \mu\text{g/mL}$ ). Eterično ulje iz Betlehema je pak imalo veće inhibicijsko djelovanje na COX-2 ( $IC_{50} = 81,73 \pm 1,85 \mu\text{g/mL}$ ) u odnosu na ulje iz Jenina ( $IC_{50} = 93,83 \pm 2,01 \mu\text{g/mL}$ ). Ovi rezultati ukazuju na moguću terapijsku primjenu eteričnog ulja *A. arborescens* L. iz obje regije Palestine u svrhu prevencije i liječenja određenih patogenih infekcija, karcinoma, upala i neurodegenerativnih bolesti. (72)

**Tablica 3.** Postotak inhibicije COX-1 i COX-2 eteričnim uljima *A. arborescens* iz Betlehema i Jenina (72)

	Eterično ulje Jenin	Eterično ulje Betlehem	Eterično ulje Jenin	Eterično ulje Betlehem
	<b>COX-1</b>		<b>COX-2</b>	
50 $\mu\text{g/mL}$	75,6	38,9	26,7	38,1
350 $\mu\text{g/mL}$	92	58,8	95,3	66,8

S.Zouari i suradnici su 2010. godine objavili znanstveni članak pod nazivom „*Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian Artemisia herba alba Asso*“ u Tunisu. (73) Nadzemni dijelovi *A. herba-albae* prikupljeni su u Gafsi (planina Ayaycha), grada u jugozapadnom dijelu Tunisa u fazi cvatnje (siječanj 2009.). Svježa biljna tvar prvo je izvagana te je potom ostavljena da se suši na zraku. Osušeni listovi i cvjetovi podvrgnuti su četverosatnoj hidrodestilaciji, koja se izvodila u aparaturi po Clevengeru. Eterično ulje osušeno je djelovanjem bezvodnog natrijevog sulfata, filtrirano i čuvano u zatvorenoj bočici na tamnom mjestu, na temperaturi od 4 °C prije analize i bioloških testova. Uzorak eteričnog ulja *A. herba alba* L. kemijski je analiziran kombinacijom plinske kromatografije i masene spektroskopije (GC/MS) u svrhu određivanja glavnih sastavnica. Najzastupljenije komponente ulja bili su *cis*-krizantenil-acetat (10,6 %), sabinil-acetat (9,13 %),  $\alpha$ -tujon (8,73 %), davana eter (nepoznati izomer) (6,16 %) i krizantenon (4,94 %). S obzirom da se eterična ulja *A. herba alba* L. uzgojene u južnom Tunisu već godinama koriste u narodnoj medicini za liječenje povišenog krvnog tlaka, odnosno hipertenzije ispitana je inhibicijska sposobnost ulja na angiotenzin konvertirajući enzim (ACE). Dobiveni rezultati pokazali su da 100  $\mu$ g/mL eteričnog ulja *A. herba-alba* L. ima inhibitornu aktivnost na ACE od 25,4 %. S obzirom na činjenicu da sintetski ACE inhibitori mogu uzrokovati razne neželjene nuspojave, ovim studijama je dokazano da su biljna eterična ulja poput eteričnog ulja *A. herba alba* L. prirodan i ekonomičan ACE inhibitor koji se može koristiti za prevenciju i liječenje povišenog krvnog tlaka. (73)



**Slika 35.** Inhibitorni učinak eteričnog ulja *A. herba alba* L. na angiotenzin konvertirajući enzim (ACE). (73)

Z. Yu i suradnici 2009. godine objavili su znanstveni članak pod nazivom „Chemical Composition and Anti-acetylcholinesterase Activity of Flower Essential Oils of *Artemisia annua* at Different Flowering Stage“. (74) Biljni materijal *A. annuae* L. koji se koristio u ovom istraživanju prikupljen je na području Chongqinga, u Kini. Cvjetovi su brani u različitim fazama cvatnje, odnosno prije cvatnje, za vrijeme cvatnje te nakon cvatnje u razdoblju od rujna do studenog 2007. godine. Tri vrste biljnog materijala podvrgnute su šestosatnoj hidrodestilaciji u aparaturi po Clevengeru. Dobiveni uzorci eteričnog ulja osušeni su djelovanjem bezvodnog natrijevog sulfata te su ostavljeni na 4 °C do daljnje analize. U svrhu određivanja sastava ovog eteričnog ulja korištene su plinska kromatografija i masena spektroskopija. Glavne komponente eteričnog ulja dobivenog iz biljnog materijala prikupljenog prije cvatnje bili su  $\beta$ -mircen (37,71 %), 1,8-cineol (16,11 %) i kamfor (14,97 %). Eteričnim uljem dobivenim iz biljnog materijala prikupljenog u fazi cvatnje dominirali su kariofilen (19,4 %), germakren D (18,1 %), kamfor (15,84 %) i 1,8-cineol (10,6 %), dok su najzastupljenije komponente eteričnog ulja dobivenog iz biljnog materijala prikupljenog poslije cvatnje bili kamfor (16,62 %), kariofilen (16,27 %),  $\beta$ -kariofilen oksid i  $\beta$ -farnesen. Inhibicijska sposobnost eteričnog ulja *A. annua* L. na enzim AChE određivana je metodom po Ellmanu. Najveću inhibicijsku sposobnost pokazalo je eterično ulje *A. annua* L. dobiveno od biljnog materijala sakupljenog nakon cvatnje ( $IC_{50} = 0,13 \pm 0,02$  mg/mL). Analiza ovih rezultata pokazuje umjerenu inhibiciju AChE od strane eteričnog ulja *A. annuae* L.  $IC_{50}$  za takrin, lijek koji se inače koristi u liječenju blage do umjerene Alzheimerove bolesti iznosio je  $5 \times 10^{-5}$  mg/mL. Rezultati inhibicije dani su u tablici 4.

**Tablica 4.** Inhibicijski učinak eteričnog ulja biljke *Artemisia annua* sabrane u različitim periodima cvatnje na enzim acetilkolin esterazu (AChE). (74)

	<i>A. annua</i> (prije cvatnje)	<i>A. annua</i> (cvatnja)	<i>A. annua</i> (poslije cvatnje)	Takrin
$IC_{50}$ (mg/mL)	$1,25 \pm 0,09$	$2,92 \pm 0,16$	$0,13 \pm 0,02$	$5,0 \times 10^{-5}$

Inhibicijska sposobnost eteričnog ulja dobivenog iz cvjetova *A.annuae* L. najviše se pripisuje  $\alpha$ -pinenu,  $\beta$ -pinenu, limonenu, kamforu, borneolu,  $\alpha$ -terpineolu,  $\beta$ -kariofilenu i  $\beta$ -kariofilenovom oksidu. Različite inhibicijske sposobnosti ovih triju uzoraka najvjerojatnije su rezultat različitog sadržaja terpenoida i njihovih različitih interakcija s AChE. (74)

M. Taherkhani je 2017. god. Objavio znanstveni članak pod nazivom „*Chemical Constituents, Total Phenolic Content, Antimicrobial, Antioxidant and Radical Scavenging Properties, Chelating Ability, Tyrosinase Inhibition and In Vitro Cytotoxic Effects Of Artemisia aucheri Herbs*“ 2017. godine u Iranu. (75) Nadzemni dijelovi *Artemisiae aucheri* L. prikuljeni su 2011. godine na području sjeveroistočnog Irana. Listovi biljke su sušeni na sobnoj temperaturi nekoliko dana. Odvagana masa od 100 g osušenih listova podvrgnuta je trosatnoj hidrodestilaciji korištenjem aparature po Clevengeru. Nakon dekantiranja i sušenja vodene faze iznad bezvodnog natrijevog sulfata prinos eteričnog ulja iznosio je 1,25 % (w/w). Sastav eteričnog ulja analiziran je korištenjem sustava GC/MS. Identificirano je 18 komponenti koje čine 91,48 % ukupnog sastava. Kamfor (25,15 %), 1,8-cineol (18,26 %) i verbenon (16,63%) bile su glavne komponente ovog eteričnog ulja. Antitirozinazna aktivnost ulja *A. aucheri* L., izražena je ekvivalentom kvercetina (QE). Maksimalni postotak antitirozinazne aktivnosti eteričnog ulja *A.aucheri* L. iznosio je  $38,14 \pm 3,63$  % pri 5 mg. Antitirozinazna aktivnost ulja *A. aucheri* L. pri 50 % inhibiciji (IC<sub>50</sub>) bila je 6,43 mg . Inhibicija tirozinaze eteričnim uljima *A.aucheri* L. glavna je meta u liječenju hipertenzije i poremećaja pigmentacije kože. Dobiveni rezultati prikazani u tablici 5. i 6. pokazali su da eterično ulje *A.aucheri* L. posjeduju povećanu reducirajuću moć koja čini osnovu za daljnje istraživanje inhibitornog potencijala ovog enzima. Rezultati inhibicije enzima prikazani su u tablici 5. i 6. (75)

**Tablica 5.** Sposobnost eteričnog ulja dobivenog iz listova biljke *Artemisia aucheri* da inhibira enzim tirozinazu. (75)

Eterično ulje <i>A. aucheri</i> L. (mg)	2,85	3,58	4,28	5	IC <sub>50</sub> (mg)
Koncentracija ulja u sustavu (mg/mL)	0,285	0,358	0,428	0,5	
Antitirozinazna aktivnost (%)	$19,56 \pm 0,68$	$24,37 \pm 0,35$	$30,76 \pm 3,82$	$38,14 \pm 3,63$	6,43 (0,643 mg/mL)
Ekvivalent kvercetina (mg)	0,25	0,66	1,20	1,82	

**Tablica 6.** Sposobnost kvercetina da inhibira enzim tirozinazu. (75)

Standard: kvercetin (mg)	0,025	0,05	0,1	0,5	1	2
Koncentracija gvercetina u sustavu (mg/mL)	0,0025	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2
Antitirozinazna aktivnost (%)	$15,51 \pm 0,51$	$17,01 \pm 0,88$	$18,56 \pm 0,21$	$23,15 \pm 0,17$	$28,36 \pm 0,42$	$40,05 \pm 4,30$

M. Abdoul-Latif i suradnici 2020. godine u Maroku, objavili su članak pod nazivom „*In vitro antidiabetic activity of essential oil of two species of artemisia: Artemisia herba-alba Asso and Artemisia ifranensis.*“ (68) Dvije biljke *Artemisia herba-alba* Asso L. i *Artemisia ifranensis* L. prikupljeni su u cijelosti u fazi cvjetanja iz njihovih prirodnih staništa u prosincu 2020. Biljni materijal sušen je na zraku, te je zatim zapakiran u papirnate vrećice i ostavljen na tamnom i hladnom mjestu do analize. Prije hidrodestilacije biljni materijal je samljeven. Za dobivanje eteričnog ulja iz ovih dvaju vrsta korištena je hidrodestilacija uz pomoć aparature po Clevengeru (3h). Dobivena eterična ulja čuvana su u zatvorenim bočicama na 4 °C do analize. Uzorci eteričnog ulja analizirani su GC/MS-om i GC/FID-om (engl. *gas chromatography/flame ionization detector*) u svrhu identifikacije i kvantifikacije eteričnih ulja. Analiza je pokazala da su glavni spojevi eteričnog ulja *A. herba-albae* L.  $\alpha$ -tujon (18,34 %), kamfor (17,66 %), krizantenon (10,82 %), eukaliptol (8,19 %) i  $\beta$ -tujon (5,94 %); dok su glavni spojevi *A. ifranensis*  $\beta$ -tujon (33,21 %),  $\alpha$ -bisabolon oksid B (11,25 %),  $\alpha$ -bisabolon oksid A (9,31 %) i eremoligenol (4,99 %). Provedeno je antidijabetičko djelovanje *in vitro* prema dva testa, test inhibicije  $\alpha$ -amilaze i test inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze. Rezultati ovih dvaju testova uspoređeni su sa pozitivnom kontrolom akarbozom koja je poznata po svojim inhibicijskim sposobnostima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Dobivene IC<sub>50</sub> vrijednosti prikazane su u tablici 7. (68)

**Tablica 7.** Inhibicijski učinak eteričnog ulja biljaka *Artemisia herba-alba asso* i *Artemisia ifranensis* na enzime  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu. (68)

	<i>A. herba-alba</i> <i>Asso</i>	<i>A. ifranensis</i>	akarboza
$\alpha$ -amilaza (IC <sub>50</sub> mg/mL)	1,946	1,796	0,899
$\alpha$ -glukozidaza (IC <sub>50</sub> mg/mL)	1,754	1,527	0,694

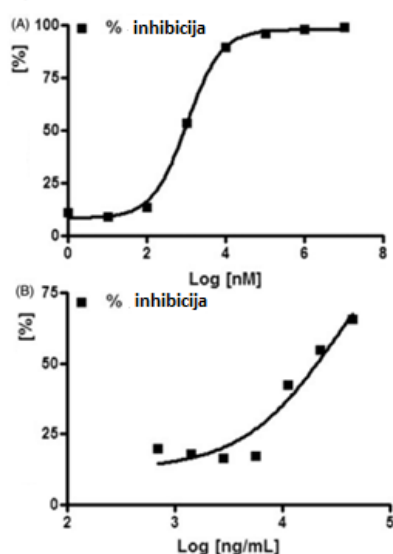
Analiza podataka eteričnih ulja obaju vrsta roda *Artemisiae* pokazuje umjerenu inhibiciju u usporedbi s akarbozom. Inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze, posebice akarboza, koriste se za snižavanje šećera u krvi osoba s tipom 2 dijabetes *mellitus*. (68)

E. Orhan i suradnici su 2010. godine u Turskoj objavili znanstveni članak pod nazivom “Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species“. (77) Biljni materijal *A. absinthium* L. prikupljen je u Alžiru u fazi cvatnje. Dok je biljni materijal *A. fragrans* L. prikupljen u Turskoj 2007. godine. Osušeni i praškasti uzorci *A. absinthium* L., i *A. fragrans* L. hidrodestilirani su u aparaturi po Clevengeru, prinos eteričnog ulja za *A. absinthium* L. i *A. fragrans* L. iznosio je 1,5 % v/w. Uzorci eteričnih ulja analizirani su GC/MS sustavom. Glavna komponenta eteričnog ulja *A. absinthium* L. bio je kamazulen ( $31,27 \pm 0,29$  %, v/w), s obzirom da je dobiveno ulje bilo tamnplave boje, takva boja se pripisuje derivatu azulena što je upravo kamazulen. Nakon kamazulena najzastupljenije komponente ovog eteričnog ulja bile su kamfor ( $16,54 \pm 0,05$  %) i nepoznata komponenta ( $15,69 \pm 0,25$  %). S druge strane eteričnim uljem *A. fragrans* L. dominirali su  $\alpha$ -tujon ( $39,80 \pm 0,09$  %), kamfor ( $27,44 \pm 0,05$  %),  $\beta$ -tujon ( $13,18 \pm 0,02$  %) i eukaliptol ( $10,25 \pm 0,04$  %). Inhibicijska sposobnost eteričnih ulja na AChE i BChE ispitana je modificiranom Ellmanovom metodom. Rezultati inhibicije kolinesteraza pri koncentraciji od 25, 50 i 100  $\mu\text{g/mL}$  prikazani su u tablici 8. Dobiveni rezultati pokazuju vrlo slab inhibicijski potencijal (ispod 20 %) ovih eteričnih ulja na AChE i BChE. (76)

**Tablica 8.** Inhibicija eteričnim uljima *A. absinthium* i *A. fragrans* na AChE i BChE (76)

Vrsta	Tip ekstrakta	Inhibicija AChE			Inhibicija BChE		
		25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
<i>A. absinthium</i> L.	Eterično ulje	12,74 $\pm$ 1,41	12,86 $\pm$ 0,86	18,02 $\pm$ 1,26	6,89 $\pm$ 0,4 4	12,76 $\pm$ 0,9 5	
<i>A. fragrans</i> L.	Eterično ulje	13,85 $\pm$ 1,97	18,79 $\pm$ 1,39	18,63 $\pm$ 1,26	/	/	/

Srivastava i suradnici su 2015. godine u Indiji objavili znanstveni članak pod nazivom „*Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of Artemisia maderaspatana essential oil*“. (77) Nadzemni dijelovi *A. maderaspatanae* L. prikupljeni su u ranom stadiju razvoja na tri različita geografska područja u Indiji. Svježi biljni materijal hidrodestilirano je u aparaturi po Clevengeru. Dobiveni destilat, eterično ulje, zasićeno je NaCl-om te je zatim ekstrahirano *n*-heksanom i diklorometanom. Prinos eteričnog ulja iznosio je 0,06 % (v/w). Uzorci su pohranjeni na 20 °C do daljnje analize. Provedene su kvantitativne i kvalitativne analize eteričnih ulja koristeći GC–MS. Dobiveni rezultati pokazali su da eterična ulja iz *A. maderaspatanae* L. karakteriziraju visoki postotci monoterpena (5,7 %) kao što je  $\beta$ -mircen (4,3 %); seskviterpena (76,3 %) od kojih su najznačajniji  $\alpha$ -humulen (46,3 %),  $\beta$ -kariofilen (9,3 %),  $\alpha$ -kopaen (8,2 %), *Z,E*- $\alpha$ -farnezen (3,7 %) i kalaren (3,5 %). Inhibicijski potencijal AChE djelovanjem eteričnog ulja *A. maderaspatanae* L. mjereno je Ellmanovom metodom pri različitim koncentracijama. U ovim eksperimentalnim uvjetima, IC<sub>50</sub> vrijednost fizostigmina i eteričnog ulja *A. maderaspatanae* L. iznosila je 1,03  $\mu$ g/mL, odnosno 31,33  $\mu$ g/mL. Iako inhibicija AChE eteričnim uljem *A. maderaspatanae* L. nije učinkovita kao standardni lijek fizostigmin, njezina inhibicijska sposobnost ne može se zanemariti. Hlapljive organske komponente eteričnog ulja *Artemisiae maderaspatanae* L., među kojima su  $\beta$ -mircen,  $\alpha$ -kopaen,  $\beta$ -kariofilen, humulen, *Z,E*- $\alpha$ -farnezen, pokazuju umjerenu inhibiciju AChE. Na slici 34. prikazana je inhibicijska aktivnost fizostigmina u usporedbi s inhibicijskom aktivnošću ispitivanog eteričnog ulja na AChE i BChE. (77)



**Slika 36.** Inhibicijska aktivnost fizostigmina (A) i eteričnog ulja *A. maderaspatanae* (B) na enzime AChE. (77)

Učinkovit potencijal inhibicije AChE eteričnim uljem *A. maderaspatanae* L. čini ovu biljku prikladnom za daljnje istraživanje njezinih kemijskih i bioloških potencijala. Inhibicijska sposobnost eteričnog ulja *A. maderaspatana* L. nije posljedica jednog snažnog inhibitora, već sinergističkog djelovanja nekoliko spojeva ove biljke. (77)

„Essential oil variability in natural populations of *Artemisia campestris* (L.) and *Artemisia herba-alba* (Asso.) and incidence on antiacetylcholinesterase and antioxidant activities“ naslov je znanstvenog članka objavljenog od strane F. Younsia i suradnika 2017. god. (79) Nadzemni dijelovi *A. herba-alba* L. i *A. campestris* L. sakupljeni su tijekom faze cvatnje biljaka u listopadu i studenom mjesecu 2014. godine na različitim geografskim i bioklimatskim područjima u Tunisu. Iz svake populacije nasumično je uzorkovano deset biljaka. Biljni materijal sušen je na zraku na sobnoj temperaturi u periodu od dva tjedna. Uzorak od 100 g biljnog materijala hidrodestiliran je 3 sata u aparaturi po Clevengeru. Sastav eteričnog ulja *A. herba-albae* L. i *A. campestris* L. analiziran je korištenjem sustava GC/MS. Glavne komponente eteričnog ulja *A. herba-alba* L. bili su kamfor (19,61 %),  $\alpha$ -tujon (19,40 %),  $\beta$ -tujon (9,44 %), krizantenon (9,26 %), *trans*-sabinil acetat (8,43 %), 1,8-cineol (4,93 %) i germakren D (4,51 %); dok su glavne komponente eteričnog ulja *A. campestris* L. bile germakren D (16,38 %),  $\beta$ -pinen (16,33 %), limonen (9,17 %), *p*-cimen (6,62 %),  $\gamma$ -terpinen (5,79 %) i  $\alpha$ -pinen (4,66 %). Inhibicijska sposobnost mjerena je na modificirani način koji su opisali Eldeen i suradnici. (80) Rezultati su izraženi kao IC<sub>50</sub> (koncentracija koja osigurava 50 % inhibicije AChE). Donepezil, inhibitor kolinesteraze korišten u liječenju Alzheimerove bolesti, uzet je kao pozitivna kontrola. Analizom rezultata otkrivena je značajna inhibicijska sposobnost acetilkolin esteraze eteričnim uljima *A. herba-alba* i *A. campestris* L. Međutim, stupanj inhibicije AChE značajno je varirao ovisno o vrsti analiziranih ulja. Za eterična ulja *A. herba -alba*, najbolje inhibicijsko djelovanje (IC<sub>50</sub> = 0,05 mg/mL) zabilježeno je za populaciju 4. Varijacija između populacija uglavnom se pripisuje razlikama u sastavu pojedinih komponenti, poput kamfora, borneola, verbenona i karvona. Populacija 2 *A. campestris* L. pokazala je najjaču inhibicijsku sposobnost acetilkolinesteraze (IC<sub>50</sub> = 0,02 mg/mL), dok je populacija 7 pokazala najmanji učinak (IC<sub>50</sub> = 0,79 mg/mL). Rezultati inhibicijske sposobnosti ovih vrsta *Artemisiae* prikazani su u tablici 9. (78)



**Tablica 9.** Inhibicijski učinak eteričnih ulja različitih populacija biljke *Artemisia herba-alba* iz Tunisana enzim AChE. (78)

	Inhibicija AChE (IC <sub>50</sub> , mg/mL)
<b>Ah1</b>	0,07±0,01
<b>Ah2</b>	0,16±0,03
<b>Ah3</b>	0,14±0,06
<b>Ah4</b>	0,17±0,04
<b>Ah5</b>	0,10±0,02
<b>Ah6</b>	0,08±0,03
<b>Ah7</b>	0,11±0,01
<b>Ah8</b>	0,09±0,02
<b>Ah9</b>	0,06±0,01
<b>Ah10</b>	0,08±0,02
<b>Ah11</b>	0,05±0,01
<b>Ah12</b>	0,07±0,02
<b>Ac1</b>	0,04±0,03
<b>Ac2</b>	0,02±0,04
<b>Ac3</b>	0,32±0,06
<b>Ac4</b>	0,28±0,08
<b>Ac5</b>	0,20±0,01
<b>Ac6</b>	0,59±0,08
<b>Ac7</b>	0,79±0,06
<b>Donepezil</b>	18 ±0,4 µg/mL

Ah=*A. herba-alba*; Ac=*A. campestris* (populacije: Ah1:Gabes, Ah2: Mritba, Ah3: El Ghraba, Ah4: Msaken, Ah5: Haouarib, Ah6: Jelma, Ah7: Aïn Errahma, Ah8: Sousse, Ah9: Kerker, Ah10: El Ksour, Ah11: Kalaat-Senan, Ah12: Tajerouine. Ac1: Mritba, Ac2: Jelma, Ac3: Haouarib, Ac4: Aïn Errahma, Ac5: Sousse, Ac6: Kerker, Ac7: Kesra).

B. Amina i suradnici 2022. godine objavljuju članak pod nazivom. „*Chemical profiling, antioxidant, enzyme inhibitory and in silico modeling of Rosmarinus officinalis L. and Artemisia herba alba Asso. essential oils from Algeria*“. (80) Između ostaloga, istraživanje se temeljilo na provjeravanju inhibicijske sposobnosti eteričnih ulja *Artemisiae* vrsta na  $\alpha$ -glukozidazu,  $\alpha$ -amilazu i kolinesteraze (AChE i BChE). Biljni materijal prikupljen je u vrijeme cvatnje u sjeveroistočnom Alžiru. Prije same analize, uzorci su ostavljeni da se suše na sobnoj temperaturi 2 tjedna. Samljeveni biljni materijal podvrgnut je hidrodestilaciji u aparaturi po Clevengeru. Dobiveni uzorci eteričnog ulja analizirani su kombinacijom GC-MS i GC-FID. Analizom je utvrđeno da su  $\beta$ -kopaen (16,22 %), limonen (14,56 %), eukaliptol

(14,49 %) i kamfor (13,74 %) glavne komponente eteričnog ulja *A. herba alba*. Metoda jod/kalijev jodid korištena je za ispitivanje inhibicijske sposobnosti  $\alpha$ -amilaze. Za ispitivanje inhibicijske sposobnosti  $\alpha$ -glukozidaze korištena je metoda koju su opisali Zengin i suradnici (2016.) (81), dok je Ellmanova metoda bila korištena za procjenu inhibicijske sposobnosti kolinesteraza, AChE i BChE. Akarboza je korištena kao standard u testovima inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze, a galantamin u testovima inhibicije acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 10.

**Tablica 10.** Inhibicijski učinak eteričnog ulja biljke *Artemisia herba alba* na enzime  $\alpha$ -amilazu,  $\alpha$ -glukozidazu, AChE i BChE. (80)

	$\alpha$ -amilaza	$\alpha$ -glukozidaza	AChE	BChE
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	1,93	1,15	4,60	8,70
Standard*	2,30	8,50	3,50	6,40

\* Akarboza je korištena kao standard enzima  $\alpha$ -amilaza i  $\alpha$ -glukozidaza; Galantamin je korišten kao standard enzima AChE i BChE.

Naime, inhibicijska sposobnost kolinesteraza uvelike ovisi o dozi i prirodi eteričnog ulja *A. herba alba*. Sposobnost inhibicije AChE od strane ovog eteričnog ulja može se objasniti velikim udjelom monoterpena u kemijskom sastavu. Što se tiče antidijabetičkih enzima, eterično ulje *A. herba alba* također pokazuje znatnu inhibicijsku sposobnost  $\alpha$ -glukozidaze (IC<sub>50</sub> = 1,15 mg/mL) i  $\alpha$ -amilaze (IC<sub>50</sub> = 1,93 mg/mL). (80)

Deset biljnih vrsta roda *Artemisia* testirano je na sposobnost njihovih eteričnih ulja da inhibiraju neki od enzima koji imaju važnu ulogu u tretmanu bolesti u ljudi. Te su vrste: *Artemisia absinthium*, *A. alba*, *A. annua*, *A. arborescens*, *A. aucheri*, *A. campestris*, *A. fragrans*, *A. infranensis*, *A. macrocephala* i *A. maderaspatana*. Enzimi koji su pri tom inhibirani su acetilkolinesteraza (AChE), butirilkolinesteraza (BChE),  $\alpha$ -amilaza,  $\alpha$ -glukozidaza, tirozinaza, angiotenzin konvertirajući enzim (ACE), ciklooksigenaza 1 (COX-1) i ciklooksigenaza 2 (COX-2). Rezultati su prikazani tablicom 11.

**Tablica 11.** Rezultati testiranja eteričnih ulja roda biljaka *Artemisia* na inhibiciju enzima

	<b>Porijeklo / dio biljke</b>	<b>Glavne komponente ulja</b>	<b>Enzim</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>Literat. referenc a</b>
<i>A. absinthium</i>	Iran / list	1,8-cineol (36,46 %), borneol (25,99 %), kamfor (10,20 %)	tirozinaza	0,452 µg/mL	62
<i>A. absinthium</i>	Alžir / nadzemni dijelovi biljke	kamazulen (31,27 ± 0,29 %, v/w), kamfor (16,54 ± 0,05%), nepoznata komponenta (15,69 ± 0,25 %)	AChE	18,02±1,26 (100 µg/mL)	76
			BChE	12,76±0,95 (100 µg/mL)	
<i>A. herba alba</i>	Alžir / nadzemni dijelovi biljke	$\beta$ -kopaen (16,22 %), limonen (14,56%), eukaliptol (14,49%), kamfor (13,74%)	$\alpha$ -amilaza	1,93 mg/mL akarboza = 2,30 mg/mL	80
			$\alpha$ -glukozidaza	1,15 mg/mL Akarboza = 8,50 mg/mL	
			AChE	4,60 mg/mL galantamin = 3,50 mg/mL	
			BChE	8,70 mg/mL aalantamin = 6,40 mg/mL	
<i>A. herba alba</i> Asso	Maroko / nadzemni dijelovi biljke	$\alpha$ -tujon (18,34 %), kamfor (17,66 %), krizantenon (10,82 %), eukaliptol (8,19 %) i $\beta$ -tujon (5,94 %)	$\alpha$ -amilaza	1,946 mg/mL Akarboza = 0,899 mg/mL	68
			$\alpha$ -glukozidaza	1,754 mg/mL Akarboza = 0,694 mg/mL	
<i>A. herba alba</i> (populacija 4)	Tunis / nadzemni dijelovi biljke	kamfor (19,6 %), $\alpha$ -tujon (19,40%), $\beta$ -tujon (9,44%), krizantenon (9,26%), <i>trans</i> -sabinil acetat (8,43%), 1,8-cineol (4,93%) i	AChE	0,05 mg/mL donepezil = 18 ± 0,4 µg/mL	78

		germakren D (4,51%)			
<b><i>A. herba alba Asso</i></b>	Tunis / nadzemn i dijelovi biljke	cis-krizantenil-acetat (10,6%), sabinil-acetat (9,13%), $\alpha$ -tujon (8,73%), davana eter (nepoznati izomer) (6,16%) i krizantenon (4,94%).	ACE	25,4% (100 $\mu$ g/mL)	73
<b><i>A. annua</i></b>	Kina / cvijet		AChE		74
	prije cvatnje			1.25 $\pm$ 0.09 mg/mL Takrin = 5x10 <sup>-5</sup> mg/mL	
	cvatnja			2.92 $\pm$ 0.16 mg/mL L Takrin = 5x10 <sup>-5</sup> mg/mL	
	poslije cvatnje			0.13 $\pm$ 0.02 mg/mL L Takrin = 5x10 <sup>-5</sup> mg/mL	
<b><i>A. arborescens (Jenin)</i></b>	Palestina / list	$\beta$ -tujon (79,16%), kamfor (6,58%), sabinen (3,44%)	COX-1 COX-2	1,8 $\pm$ 0,75 $\mu$ g/mL 93,83 $\pm$ 2,01 $\mu$ g/mL	72
<b><i>A. arborescens (Betlehem)</i></b>	Palestina / list	$\beta$ -tujon (89,64%), kamfor (5,34 %) i $\beta$ -pinen (2,01 %)	COX-1 COX-2	- 81,73 $\pm$ 1,85 $\mu$ g/mL	
<b><i>A. aucheri</i></b>	Iran / nadzemn i dijelovi biljke	kamfor (25,15%), 1,8-cineol (18,26%), verbenon (16,63%)	tirozinaza	6,43 mg/mL	75
<b><i>A. campesteris (populacija 2)</i></b>	Tunis / nadzemn i dijelovi biljke	germakren D (16,38 %), $\beta$ -pinen (16,33 %), limonen (9,17 %), p-cimen (6,62 %), $\gamma$ -terpinen (5,79 %) i $\alpha$ -pinen (4,66%)	AChE	0,02 mg/mL Donepezil=18 $\pm$ 0,4 $\mu$ g/mL	78
<b><i>A. fragrans</i></b>	Turska / nadzemn	$\alpha$ -tujon (39,80%), kamfor (27,44%),	AChE	18,63 $\pm$ 1,26 (100 $\mu$ g/mL)	76

	i dijelovi biljke	$\beta$ -tujon (13,18%), eukaliptol (10,25%)	BChE	-	
<i>A. infranensis</i>	Maroko / nadzemni dijelovi biljke	$\beta$ -tujon (33,21%), $\alpha$ -bisabolon oksid B (11,25%), $\alpha$ -bisabolon oksid A (9,3 %), eremoligenol (4,99%)	$\alpha$ -amilaza	1,796 mg/mL akarboza = 0,899 mg/mL	68
			$\alpha$ -glukozidaza	1,527 mg/mL akarboza = 0,694 mg/mL	
<i>A. macrocephala</i>	Pakistan / stabljika	$\alpha$ -tujon (56,2%), 3-tujanon (11,7%), cineol (10,8%)	AChE	40 $\mu$ g/mL	66
			BChE	30 $\mu$ g/mL	
<i>A. maderaspatana</i>	nadzemni dijelovi biljke	$\alpha$ -humulen (46,3%), $\beta$ -kariofilen (9,3%), $\alpha$ -kopaen (8,2%),	AChE	31,33 $\mu$ g/mL fizostigmin = 1,03 $\mu$ g/mL	60

AChE= acetilkolinesteraza; BChE= butirilkolinesteraza; ACE= angiotenzin konvertirajući enzim, COX=ciklooksigenaza

Pregledom svih prikupljenih rezultata može se uočiti da neka eterična ulja testirana na sposobnost inhibicije enzima nemaju testiranu i pozitivnu kontrolu (poznato dobar inhibitor navedenog enzima) tako da se kod takvih uzoraka ne može zaključivati o njihovom inhibicijskom potencijalu.

Eterično ulje biljke *Artemisia alba* sa čak četiri lokacije testirano je na sposobnost inhibicije čak 5 različitih enzima (AChE, BChE, ACE,  $\alpha$ -amilaza i  $\alpha$ -glukozidaza). Rezultati su pokazali da eterično ulje izolirano iz nadzemnog dijela ove biljne vrste iz Alžira pokazuje najbolju sposobnost inhibicije, osobito enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) koji pokazuju tek nešto slabiju aktivnost u odnosu na onu za poznato dobar inhibitor ovog enzima, galantamin. Sposobnost ovog enzima da enzim inhibira s 50 %-tnim učinkom za enzim AChE iznosi  $IC_{50} = 4,60$  mg/mL, dok za BChE iznosi  $IC_{50} = 8,70$  mg/mL, u odnosu na one za galantamin koje iznose  $IC_{50} = 3,50$  (AChE) i  $IC_{50} = 6,40$  mg/mL (BChE). Dobar inhibicijski učinak ovo eterično ulje pokazuje i na enzim  $\alpha$ -amilazu ( $IC_{50} = 193$  mg/mL) u odnosu na akarbozu ( $IC_{50} = 2,30$  mg/mL). Glavne komponente ovog eteričnog ulja bile su  $\beta$ -kopaen (16,22 %), limonen (14,56 %), eukaliptol (14,49 %) i kamfor (13,74 %). Eterično ulje ove biljne vrste izolirano iz nadzemnih dijelova biljke sabrane u Maroku pokazuje srednje dobar inhibicijski učinak na enzim  $\alpha$ -amilazu ( $IC_{50} = 1,946$  mg/mL) i  $\alpha$ -glukozidazu ( $IC_{50} =$

1,754 mg/mL), u odnosu na akarbozu ( $IC_{50} = 0,899$  i  $0,694$  mg/mL).  $\beta$ -tujon (33,21 %),  $\alpha$ -bisabolon oksid B (11,25 %),  $\alpha$ -bisabolon oksid A (9,3 %) i eremoligenol (4,99 %) su najzastupljenije komponente ovog ulja. Ostala testirana eterična ulja ove biljke ne pokazuju značajniju sposobnost inhibicije na testirane enzime.

Eterično ulje biljke *Artemisia infranensis* izolirano iz nadzemnog dijela biljke sabrane u Maroku pokazuje srednje dobru sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze ( $IC_{50} = 1,796$  mg/mL) i  $\alpha$ -glukozidaze ( $IC_{50} = 1,527$  mg/mL) u odnosu na akarbozu ( $IC_{50} = 0,899$  i  $0,694$  mg/mL). U sastavu ovog ulja dominiraju sljedeće komponente:  $\beta$ -tujon (33,21 %),  $\alpha$ -bisabolon oksid B (11,25 %),  $\alpha$ -bisabolon oksid A (9,3 %) i eremoligenol (4,99 %).

Sva ostala testirana eterična ulja pokazuju lošu sposobnost inhibicije testiranih enzima ili se njihov inhibicijski potencijal ne može procijeniti.

## 4 ZAKLJUČAK

Cilj ovog završnog rada bio je pregled dostupne znanstvene literature na temu *in vitro* inhibicije enzima eteričnim uljima biljaka roda *Artemisia*. Brojna bolesna stanja u ljudi tretiraju se ili preveniraju na način da se enzimi ključni u procesima vezanim uz pojedina bolesna stanja inhibiraju. Obzirom da se uz lijekove koji se koriste u tretmanima ovih i sličnih bolesti vezuju i određene nuspojave, znanstvena zajednica je u stalnoj potrazi za tvarima izoliranim iz prirode koji će pomoći u tretmanu pojedinih bolesnih. Kao izvori podataka koristile su se dostupne relevantne znanstvene baze podataka Web of Science Core Collection i Scopus.

Deset biljnih vrsta roda *Artemisia* testirano je na sposobnost njihovih eteričnih ulja da inhibiraju neki od enzima koji imaju važnu ulogu u tretmanu bolesti u ljudi. To su vrste: *Artemisia absinthium*, *A. alba*, *A. annua*, *A. arborescens*, *A. aucheri*, *A. campestris*, *A. fragrans*, *A. infranensis*, *A. macrocephala* i *A. maderaspatana*. Enzimi koji su pri tom inhibirani su acetilkolinesteraza (AChE), butirilkolinesteraza (BChE),  $\alpha$ -amilaza,  $\alpha$ -glukozidaza, tirozinaza, angiotenzin konvertirajući enzim (ACE), ciklooksigenaza 1 (COX-1) i ciklooksigenaza 2 (COX-2).

Eterično ulje biljke *Artemisia alba* sa čak četiri lokacije testirano je na sposobnost inhibicije čak 5 različitih enzima (AChE, BChE, ACE,  $\alpha$ -amilaza i  $\alpha$ -glukozidaza). Rezultati su pokazali da eterično ulje izolirano iz nadzemnog dijela ove biljne vrste iz Alžira pokazuje najbolju sposobnost inhibicije, osobito enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) koji pokazuju tek nešto slabiju aktivnost u odnosu na onu za poznato dobar inhibitor ovog enzima galantamin. Dobar inhibicijski učinak ovo ulje pokazuje i na enzim  $\alpha$ -amilazu. Glavne komponente ovog eteričnog ulja bile su  $\beta$ -kopaen, limonen, eukaliptol i kamfor.

Eterično ulje izolirano iz nadzemnih dijelova biljke *Artemisia alba* prikupljene u Maroku pokazuje srednje dobar inhibicijski učinak na enzim  $\alpha$ -amilazu i  $\alpha$ -glukozidazu, u odnosu na akarbozu.  $\beta$ -tujon,  $\alpha$ -bisabolon oksid B,  $\alpha$ -bisabolon oksid A i eremoligenol najzastupljenije su komponente ovog eteričnog ulja. Ostala testirana eterična ulja ove biljke ne pokazuju značajniju sposobnost inhibicije na testirane enzime.

## 5 LITERATURA

1. URL: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Pelin> (12.8.2022.)
2. D. Lopes-Lutz, D. S. Alviano, C. S. Alviano, P. P. Kolodziejczyk, (2008). *Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils*. *Phytochemistry*, 69(8), 1732–1738.
3. G. Alaerts, S. Pieters, H. Logie, J. Van Erps, M. Merino-Arevalo, B. Dejaegher, J. Smeyers-Verbeke, Y. Vander Heyden, *Exploration and classification of chromatographic fingerprints as additional tool for identification and quality control of several Artemisia species*, *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*
4. M. McGuffin., *Botanical Safety Handbook*, American Herbal Products Association, (1999) CRS Press LLC, FL, USA.
5. URL: <http://www.zenasamja.me/zdravlje/3008/pelin---lijeci-zeludac-uklanja-gliste-prociscava-krv> (12.8.2022.)
6. URL: <https://www.plantea.com.hr/jednogodisnji-pelin/> (12.8.2022.)
7. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Artemisinin> (12.8.2022.)
8. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Artemisinin> (12.8.2022.)
9. URL: <https://www.plantea.com.hr/pravi-pelin/> (12.8.2022.)
10. N.-S. D. Sotiropoulou, M. K. Kokkini, S.-F. P. Megremi, D. J. Daferera, E. P. Skotti, A. C. Kimbaris, M. G. Polissiou, P. A. Tarantilis, *Determination of A- and B- Thujone in Wormwood and Sage Infusions of Greek Flora and Estimation of their Average Toxicity*, *Journal Current Research in Nutrition and Food Science*  
doi: <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.21>
11. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Thujone> (13.8.2022.)



12. URL: <https://www.plantea.com.hr/divlji-pelin/> (13.8.2022.)
13. URL: <https://www.plantea.com.hr/estragon/> (13.8.2022.)
14. URL: <https://www.extrasynthese.com/monoterpene/357-estragole.html> (17.8.2022.)
15. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Elemicin#section=Structures> (17.8.2022.)
16. URL: <https://www.guidechem.com/dictionary/en/3387-41-5.html> (17.8.2022.)
17. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Artemisia\\_herba-alba](https://en.wikipedia.org/wiki/Artemisia_herba-alba) (25.8.2022.)
18. URL: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.79901.html> (25.8.2022.)
19. I. Stappen, J. Wanner, N. Tabanca, D. E. Wedge, A. Ali, I. A. Khan, V.K. Kaul, B. Lal, V. Jaitak, V. Gochev, T. Girova, A. Stoyanova, E. Schmidt, L. Jirovetz, *Chemical composition and biological effects of Artemisia merittima and Artemisia nilagirica essential oil from wild plants of western Himalaya*, *Planta Medica*, 80 (2014) 1079-1087.
20. URL: <http://www.freenatureimages.eu/plants/Flora%20AB/Artemisia%20maritima%2C%20Sea%20Wormwood/index.html> (25.8.2022.)
21. <https://en.wikipedia.org/wiki/Santonin> (26.8.2022.)
22. M. Farghadan, H. Ghafoori, F. Vakhshiteh, S. A. S. Fazeli, P. Farzaneh, P. Kokhaei, *The Effect of Artemisia fragrans Willd: Essential Oil on Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression and Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-stimulated Murine Macrophage Cell Line*, *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2016 Dec; 15
23. URL: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Artemisia\\_fragrans\\_kz03.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Artemisia_fragrans_kz03.jpg) (27.8.2022.)
24. URL: <https://www.countryfarmpereennials.com.au/product/artemisia-camphorata-camphor-wormwood/> (27.8.2022.)
25. URL: [https://bs.wikipedia.org/wiki/Policikli%C4%8Dni\\_spoj](https://bs.wikipedia.org/wiki/Policikli%C4%8Dni_spoj) (27.8.2022.)

26. H. Elazzouzi, N. Zekri, T. Zair, M. A. El Belghiti, *Volatiles profiling and antioxidant activity of Moroccan Artemisia ifranensis J. Didier and Anacyclus pyrethrum Link essential oils*, Egyptian Journal of Chemistry, **2020**.
27. URL: [https://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant\\_id=182](https://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant_id=182) (27.8.2022.)
28. URL: <https://temperate.theferns.info/plant/Artemisia+arborescens> (27.8.2022.)
29. URL: <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/>(27.8.2022.)
30. URL: <https://www.aromaterapija.biz/fito-aromaterapija/43-aromaterapija-definicija.html> (27.8.2022.)
31. URL: <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/destilacija/> (30.8.2022.)
32. URL: <http://tehnoloskeoperacije.weebly.com/1059108810771106107211121080-10791072-10761077108910901080108310721094108011121091.html> (30.8.2022.)
33. S. Marković, *Fitoaromaterapija*, Centar Cedrus, Zagreb, **2005**.
34. J. Petričić, *Farmakognozija (Farmaceutska biologija)*, I dio, Zagreb, Sveučilišna naklada Liber, **1983.**, 80-108.
35. E. Steinegger, R. Hansel, *Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie*, Springer - Verlag, Berlin - Heidelberg - New York - London - Paris - Tokyo **1988**, 261-274.
36. M. Sayyah, L. Nadjafnia, M. Kamalinejad, *Anticonvulsivant activity and chemical composition of Artemisia dracunculus L. essential oil*, J. Ethnopharmacol **2004**, 94, 283–287.
37. S. Kordali, A. Cakir, A. Mavi, H. Kilic, A. Yildirin, *Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish Artemisia species*. J. Agric. Food Chem. **2005**, 53, 1408–1416.
38. S. Kordali, R. Kotan, A. Mavi, A. Cakir, A. Ala, A. Yildirin, *Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, A. santonicum and Artemisia spicigera essential oils*, J. Agric. Food Chem. **2005**, 53, 9452–9458.

39. M. Viuda-Martos, A. E. El Gendy, E. Sendra, J. Fernández-López, K. A. Abd El Razik, E. A. Omer, J. A. Pérez-Alvarez, *Chemical composition and antioxidant and anti-listeria activities of essential oils from some Egyptian plants*, J. Agric. Food Chem. **2010**, 58, 9063–9070.
40. E. Nibret, M. Wink, *Volatile components of four Ethiopian Artemisia species extracts and their in vitro antitrypanosomal and cytotoxic activities*, Phytomedicine **2010**, 17, 369–374.
41. R. C. Padalia, R. S. Verma, A. Chauhan, C. S. Chanotiya, A. Yadov, *Variation in the volatile constituents of Artemisia annua var. CIM-Arogya during plant ontogeny*, Nat. Prod. Commun. **2011**, 6, 239–242
42. A. Rezaeinodehl, S. Khangholi, *Chemical composition of the essential oil of Artemisia absinthium growing wild in Iran*, Pak. J. Biol. Sci. **2008**, 11, 946–949.
43. D. López-Lutz, D. S. Alviano, C. S. Alviano, P. P. Kolodziejczyk, *Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils*, Phytochemistry **2008**, 69, 1732–1738.
44. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Zagreb **2013**.
45. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholinesterase> (2.9.2022.)
46. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Butyrylcholinesterase>(2.9.2022.)
47. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cholinesterase>(2.9.2022.)
48. URL: [https://www.medchemexpress.com/Targets/Gutathione%20S-transferase.html?utm\\_source=google&utm\\_medium=CPC&utm\\_campaign=target&utm\\_content=Gutathione%20Stransferase&utm\\_term=glutathione%20s%20transferase&gclid=Cj0KCQjwmouZBhDSARIsALYcourG\\_YLD3EyrIDS1hHilJ\\_sPKI\\_mj1Wg-U6SWBtKQcItYJe6XBFaUaAgEGEALw\\_wcB](https://www.medchemexpress.com/Targets/Gutathione%20S-transferase.html?utm_source=google&utm_medium=CPC&utm_campaign=target&utm_content=Gutathione%20Stransferase&utm_term=glutathione%20s%20transferase&gclid=Cj0KCQjwmouZBhDSARIsALYcourG_YLD3EyrIDS1hHilJ_sPKI_mj1Wg-U6SWBtKQcItYJe6XBFaUaAgEGEALw_wcB) (2.9.2022.)
49. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione\\_S-transferase\\_A1](https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_S-transferase_A1) (2.9.2022.)
50. URL: [https://www.plivazdravlje.hr/medicinski-leksikon/5440/Ciklooksigenaza?plivahealth\[term\]=5440](https://www.plivazdravlje.hr/medicinski-leksikon/5440/Ciklooksigenaza?plivahealth[term]=5440) (2.9.2022.)
51. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Angiotensin-converting\\_enzyme](https://en.wikipedia.org/wiki/Angiotensin-converting_enzyme) (2.9.2022.)

52. URL: <https://proleksis.lzmk.hr/733/> (2.9.2022.)
53. V.V Krasikov, D.V Karelov and L.M.Firsov,  *$\alpha$ -glucosidases*, Biochemistry (Moscow), **2001**.
54. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-glucosidase\\_inhibitor](https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-glucosidase_inhibitor) (2.9.2022.)
55. URL: [https://sh.wikipedia.org/wiki/Alfa\\_glukozidaza](https://sh.wikipedia.org/wiki/Alfa_glukozidaza) (2.9.2022.)
56. URL: <https://poliklinika-labplus.hr/alp-alkalna-fosfataza/> (2.9.2022.)
57. URL: <https://healthjade.com/amylase/> (2.9.2022.)
58. URL: <https://www.aaltoscientific.com/product/amylase/> (2.9.2022.)
59. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/aspartate-aminotransferase> (2.9.2022.)
60. URL: <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/22028-alanine-transaminase-alt> (2.9.2022.)
61. L. K. Modun, *Interna skripta za pripremu vježbe, Molekulska apsorpcijska spektrometrija*, Split, Kemijsko-tehnološki fakultet, **2003**.
62. T. Taherkhani, R. A. Zakaria, M. Taherkhani, A. Rustaiyan (2014) *Tyrosinase Inhibition, Super Oxide Anion and Nitric Oxide Radical Scavenging Properties of Artemisia absinthium Essential Oil*, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17:6, 1057-1063,  
DOI: 10.1080/0972060X.2014.908744
63. E. W. C. Chan, Y. Y. Lim, L. F. Wong, et al., Food Chem., 109(3), 477 – 483 (2008)
64. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. jr. Andres, R. M. Faetherston, *A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, Jul **1961**
65. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, **2014**.

66. M. Shoaib, I. Shah, N. Ali, S. W. A. Shah, *In vitro* acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory potentials of essential oil of *Artemisia macrocephala*. Bangladesh J Pharmacol. **2015**; 10: 87-91.

DOI: 10.3329/bjp.v10i1.21171

67. Qurrat-ul-Ain, U. Ashiq, R. A. Jamal, M. Saleem, M. Mahroof-Tahir, *Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes*, Arabian J.Chem, **2015**.

68. Abdoul-latif, Fatouma & Ainane, Ayoub & Oumaskour, Khadija & Boujaber, Nabila & Mohamed, Jalludin & Tarik, Ainane. (2021). *IN VITRO ANTIDIABETIC ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF TWO SPECIES OF ARTEMISIA: ARTEMISIA HEBA-ALBA ASSO AND ARTEMISIA IFRANENSIS*. Pharmacologyonline. 3. 812-820.

69. M. Wu, Q. Yang, Y. Wu, J. Ouyang, (2021). *Inhibitory effects of acorn (*Quercus variabilis* Blume) kernel-derived polyphenols on the activities of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and dipeptidyl peptidase IV*. Food Bioscience, 43, 101224.

70. R. Ceylan, G. Zengin, S. Uysal, V. Ilhan, A. Aktumsek, A. Kandemir, F. 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>

71. URL: <https://www.laborxing.com/products/clevenger-apparatus> (12.9.2022.)

72. N. Jaradat, M. Qneibi, M. Hawash, N. Al-Maharik, M. Qadi, M. N. Abualhasan, O. Ayesh, J. Bsharat, M. Khadir, R. Morshed, S. Yaaqbeh, S. Marei, S. Hamayel, A. Mousa, M. Daqqa, S. Bdir, *Assessing *Artemisia arborescens* essential oil compositions, antimicrobial, cytotoxic, anti-inflammatory, and neuroprotective effects gathered from two geographic locations in Palestine*, Industrial Crops and Products, Volume 176, **2022**, 114360, ISSN 0926-6690,

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114360>.

73. S. Zouari, N. Zouari, N. Fakhfakh, A. Bougatef, M. A. Ayadi, M. Neffati, *Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian Artemisia herba alba Asso*, Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(10), pp. 871-880, 18 May, **2010**.

DOI: 10.5897/JMPR09.506

74. Z. Yu, B. Wang, F. Yang, Q. Sun, Z. Yang, L. Zhu, *Chemical Composition and Anti-acetylcholinesterase Activity of Flower Essential Oils of Artemisia annua at Different Flowering Stage*, Iranian Journal of Pharmaceutical Research (**2011**), 10 (2): 265-271

DOI:10.22037/IJPR.2011.931

75. M. Taherkhani, *Chemical Composition and Anti-acetylcholinesterase Activity of Flower Essential Oils of Artemisia annua at Different Flowering Stage*, Pharmaceutical Chemistry Journal, Vol. 50, No. 11, February, 2017 (Russian Original Vol. 50, No. 11, November, **2016**) DOI 10.1007/s11094-017-1523-5

76. E. Orhana, R. Belhattabb, F.S. Senol , A.R. Gülpinar , S. Hosbas, M. Kartal, *Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of Artemisia absinthium, A. herba-alba, A. fragrans, Marrubium vulgare, M. astranicum, Origanum vulgare subsp. glandulosum and essential oil analysis of two Artemisia species*, Industrial Crops and Products, Publisher: Elsevier, November **2010**.

doi:10.1016/j.indcrop.2010.07.005

77. Jyotshna, N. Srivastava, B. Singh, D. Chanda, K. Shanker, *Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of Artemisia maderaspatana essential oil*, Pharm Biol, Early Online: 1–7, **2015** Informa Healthcare USA, Inc.

DOI: 10.3109/13880209.2014.1001405

78. F. Younsi, S. Mehdi, O. Aissi, N. Rahali, R. Jaouadi, M. Boussaid, C. Messaoud, *Essential Oil Variability in Natural Populations of Artemisia campestris (L.) and Artemisia herba-alba (Asso) and Incidence on Antiacetylcholinesterase and Antioxidant Activities*. Chem Biodivers. **2017** Jul;14(7). Epub 2017 Jun 15. PMID: 28488391.

doi: 10.1002/cbdv.201700017

79. I. M. Eldeen, E. E. Elgorashi, J. Van Staden, '*Antibacterial, antiinflammatory, anticholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine*', J. Ethnopharmacol. **2005**, 102 , 457 -464.

80. B. Amina, B. Soumeiya, B. Salim, B. Mahieddine, B. Sakina, B. Chawki, N. Francesca, V. Marzia, N. Carmine, D. B. Luigi, *Chemical profiling, antioxidant, enzyme inhibitory and in silico modeling of Rosmarinus officinalis L. and Artemisia herba alba Asso. essential oils from Algeria*, South African Journal of Botany Volume 147, July **2022**, Pages 501-510.

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.02.012>

81. G. Zengin, C. Sarikurkcu, A. Aktumsek, R. Ceylan, **2016**. *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*. Rec. Nat. Prod. 10 (2), 195–206.

