

# Kemijski sastav i citotoksična aktivnost eteričnog ulja smilja (*Helichrysum italicum*): istraživanje čistih spojeva i sinergijskih kombinacija

---

Jažić, Marijana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:059972>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-20**

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KEMIJSKI SASTAV I CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ETERIČNOG  
ULJA SMILJA (*HELICHRYSUM ITALICUM*): ISTRAŽIVANJE ČISTI  
SPOJEVA I SINERGIJSKIH KOMBINACIJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**MARIJANA JAŽIĆ**

**Matični broj: 484**

**Split, rujan 2023.**

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

**KEMIJSKI SASTAV I CITOTOKSIČNA AKTIVNOST**  
**ETERIČNOG ULJA SMILJA (*HELICHRYSUM ITALICUM*):**  
**ISTRAŽIVANJE ČISTIH SPOJEVA I SINERGIJSKIH**  
**KOMBINACIJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**MARIJANA JAŽIĆ**

**Matični broj: 484**

**Split, rujan 2023.**

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

**CHEMICAL COMPOSITION AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF  
*HELICHRYSUM ITALICUM* ESSENTIAL OIL: RESEARCH OF  
PURE COMPOUNDS AND SYNERGIC COMBINATIONS**

**BACHELOR THESIS**

**Marijana Jažić  
Parent number: 484**

**Split, September 2023**

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Kemija  
Znanstveno polje: Prirodne znanosti  
Mentor: izv. prof. dr. sc. Mila Radan

KEMIJSKI SASTAV I CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA SMILJA  
(*HELICHRYSUM ITALICUM*):  
ISTRAŽIVANJE ČISTIH SPOJEVA I SINERGIJSKIH KOMBINACIJA

Marijana Jazić, 484

**Sažetak:** Eterična ulja su smjese velikog broja različitih kemijskih spojeva, koja nastaju kao sekundarni metaboliti aromatičnih biljaka. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don., smilje, višegodišnja je biljna vrsta koja se koristi u etnomedicini i prehrambenoj industriji kao dodatak hrani, pićima i pekarskim proizvodima. Poznata su njegova različita biološka djelovanja, poput antioksidativne i antibakterijske aktivnosti. U ovom radu izvršena je izolacija eteričnog ulja smilja pomoću hidrodestilacije korištenjem aparature po Clevengeru, a kemijski sastav je određen primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS). Ispitivanja citotoksične aktivnosti eteričnog ulja provedena su *in vitro* na dvije stanične linije: humanog dermalnog fibroblasta (HDF) i staničnoj liniji karcinoma dojke (MDA-MB-231) primjenom MTT testa. Sinergistički i antagonistički citotoksični učinci odabranih komponenti iz eteričnog ulja smilja simulirani su testiranjem čistih spojeva (linalol, nerol, nerolidol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol) i njihovih smjesa na zdrave stanice fibroblasta i stanice raka dojke. Rezultati potvrđuju veću biološku aktivnost eteričnog ulja u odnosu na ukupni učinak njegovih komponenti.

**Ključne riječi:** eterično ulje, hidrodestilacija, GC-MS, karcinom dojke, MTT, MDA-MB-231.

**Rad sadrži:** 45 stranica, 16 slika, 5 tablica, 51 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada :**

- |                                      |             |
|--------------------------------------|-------------|
| 1. doc. dr. sc. Marina Zekić         | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić | član        |
| 3. izv. prof. dr. sc. Mila Radan     | mentor      |

**Datum obrane:** 21.09.2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology**  
**Study**

**Scientific area:** Natural sciences  
**Scientific field:** Chemistry  
**Supervisor:** Associate professor Mila Radan, PhD

**CHEMICAL COMPOSITION AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF (*HELICHRYSUM ITALICUM*)  
ESSENTIAL OIL:  
RESEARCH OF PURE COMPOUNDS AND SYNERGIC COMBINATIONS**  
Marijana Jažić, 484

**Abstract:** Essential oils are mixtures of numerous different chemical compounds that occur as secondary metabolites in aromatic plants. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, also known as immortelle, is a perennial plant species used in ethnobotanical medicine and the food industry as an additive in food, beverages, and bakery products. It is well-known for its various biological effects, such as antioxidant and antibacterial activities. In this study, the isolation of immortelle essential oil was carried out using hydrodistillation with Clevenger-type apparatus, and the chemical composition was determined using a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. Cytotoxicity studies of the essential oil were conducted in vitro on two cell lines: human dermal fibroblasts (HDF) and breast cancer cell line (MDA-MB-231) using the MTT assay. Synergistic and antagonistic cytotoxic effects of selected components from immortelle essential oil were simulated by testing pure compounds (linalool,  $\alpha$ -terpineol, terpinene-4-ol, nerol, and nerolidol), and their mixtures on healthy fibroblast cells and breast cancer cells. The results confirm higher biological activity of immortelle essential oil compared to the cumulative effect of its components.

**Keywords:** immortelle essential oil, hydrodistillation, GC-MS, breast cancer, MTT, MDA-MB-231

**Thesis contains:** 45 pages, 16 figures, 5 tables, 51 references  
**Original in:** Croatian

**Defence committees for evaluation and defense of bachelor thesis:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Marina Zekić, Assistant professor          | chair person |
| 2. Marina Tranfić Bakić, Assistsant professor | member       |
| 3. Associate Professor Mila Radan, PhD        | supervisor   |

**Defence date:** September, 21, 2023

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in te public library database of tUniversiSplit Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju pod mentorstvom izv. prof. dr. sc.  
Mile Radan u razdoblju od svibnja do rujna 2023. godine*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima, sestri i bratu koji su mi bili najveća podrška tijekom studiranja.*

*Također se zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Mili Radan na velikoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog rada.*



## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektometrije masa odrediti kemijski sastav i udio spojeva koji se nalaze u eteričnom ulju smilja.
- Ispitati djelovanje eteričnog ulja smilja na dvije stanične linije: staničnu liniju karcinoma dojke (MDA-MB-231) te na staničnu liniju humanog dermalnog fibroblasta (HDF).
- Ispitati sinergistički i antagonistički citotoksični učinak odabranih komponenti iz eteričnog ulja smilja simuliranjem čistih spojeva (linalol, nerol, nerolidol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol) i njihovih smjesa na staničnu liniju karcinoma dojke (MDA-MB-231) te na staničnu liniju humanog dermalnog fibroblasta (HDF).

## SAŽETAK

Eterična ulja su smjese velikog broja različitih kemijskih spojeva, koja nastaju kao sekundarni metaboliti aromatičnih biljaka. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don., smilje, višegodišnja je biljna je vrsta koja se koristi u etnomedicini i prehrambenoj industriji kao dodatak hrani, pićima i pekarskim proizvodima. Poznata su njezova različita biološka djelovanja, poput antioksidativne i antibakterijske aktivnosti. U ovom radu izvršena je izolacija eteričnog ulja smilja pomoću hidrodestilacije korištenjem aparature po Clevengeru, a kemijski sastav je određen primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS). Ispitivanja citotoksične aktivnosti eteričnog ulja provedena su *in vitro* na dvije stanične linije: humanog dermalnog fibroblasta (HDF) i staničnoj liniji karcinoma dojke (MDA-MB-231) primjenom MTT testa. Sinergistički i antagonistički citotoksični učinci odabranih komponenti iz eteričnog ulja smilja simulirani su testiranjem čistih spojeva (linalool, nerol, nerolidol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol) i njihovih smjesa na zdrave stanice fibroblasta i stanice raka dojke. Rezultati potvrđuju veću biološku aktivnost eteričnog ulja u odnosu na ukupni učinak njegovih komponenti.

**Ključne riječi:** eterično ulje smilja, hidrodestilacija, GC-MS, karcinom dojke, MTT, MDA-MB-231.

## **ABSTRACT**

Essential oils are mixtures of numerous different chemical compounds that occur as secondary metabolites in aromatic plants. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, also known as immortelle, is a perennial plant species used in ethnobotanical medicine and the food industry as an additive in food, beverages, and bakery products. It is well-known for its various biological effects, such as antioxidant and antibacterial activities. In this study, the isolation of immortelle essential oil was carried out using hydrodistillation with Clevenger-type apparatus, and the chemical composition was determined using a coupled gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. Cytotoxicity studies of the essential oil were conducted in vitro on two cell lines: human dermal fibroblasts (HDF) and breast cancer cell line (MDA-MB-231) using the MTT assay. Synergistic and antagonistic cytotoxic effects of selected components from immortelle essential oil were simulated by testing pure compounds (linalool,  $\alpha$ -terpineol, terpinene-4-ol, nerol, and nerolidol), and their mixtures on healthy fibroblast cells and breast cancer cells. The results confirm higher biological activity of immortelle essential oil compared to the cumulative effect of its components.

**Keywords:** immortelle essential oil, hydrodistillation, GC-MS, breast cancer, MTT, MDA-MB-231

## Sadržaj

<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1. OPĆI DIO.....</b>	<b>2</b>
1.1 Eterična ulja .....	2
1.2 Smilje ( <i>Helichrysum italicum</i> ).....	2
1.3 Izolacija eteričnog ulja destilacijom.....	3
1.3.1 Vodena destilacija .....	3
1.3.2 Vodeno-parna destilacija .....	4
1.4 Kemijski sastav eteričnog ulja smilja.....	5
1.5 Terpeni .....	6
1.5.1 Linalol.....	6
1.5.2 Nerol.....	7
1.5.3 Nerolidol.....	8
1.5.4 Terpeneol.....	8
1.5.5 Terpinen-4-ol.....	9
1.6 Biološka aktivnost.....	10
1.6.1 Protuupalno djelovanje .....	10
1.6.2 Antimikrobno djelovanje.....	10
1.6.3 Antioksidacijsko djelovanje .....	11
1.7 Citotoksičnost.....	11
1.8 Kromatografija .....	11
1.8.1 Plinska kromatografija (GC) .....	12
1.8.2 Plinska kromatografija spektrometrija masa (GC-MS).....	14
1.9 Rak .....	15
1.9.1 Rak dojke.....	16
1.10 Stanične linije.....	16
1.10.1 Stanična linija raka dojke MDA-MB-231 .....	16
1.11 Stanična linija ljudskog dermalnog fibroblasta (HDF).....	18
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>19</b>
2.1 Sakupljanje samoniklog bilja .....	19
2.2 Sušenje biljnog materijala .....	20
2.3 Analiza eteričnog ulja .....	20
2.4 MTT .....	21
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>23</b>
3.1 Citotoksična aktivnost na staničnim linijama karcinoma dojke i stanicama dermalnog fibroblasta.....	23

3.2	Analiza kemijskog sastava eteričnog ulja .....	25
<b>4.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>POPIS KRATICA I SIMBOLA .....</b>	<b>29</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>30</b>

## UVOD

Smilje je biljna vrsta koja se koristi u medicini i prehrambenoj industriji kao začin hrani, pićima i pekarskim proizvodima. Smilje raste uz Mediteran i priobalna područja. Biljni materijal korišten u ovom radu je sakupljen na području Hercegovine (Vitina). Podnosi visoke ljetne temperature, kamenite i krške terene. Naziva se biljkom koja nikad ne vene. Eterična ulja su smjese velikog broja različitih kemijskih spojeva, koja nastaju kao sekundarni metaboliti aromatičnih biljaka. Eterično ulje smilja se koristi u kozmetičkoj industriji za pripravu raznih krema, parfema te u medicini jer posjeduje antibakterijsko djelovanje. Eterično ulje smilja izolirano je hidrodestilacijom korištenjem aparature po Clevengeru, a kemijski sastav određen je plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (GC-MS). GC-MS je tehnika koja se koristi za određivanje hlapljivih spojeva u nekom uzorku. Uzorak se injektira u plinski kromatogram i prevodi u plinovito stanje.

Terpeni su najvažniji sastojci eteričnog ulja smilja. Najzastupljeniji spojevi su seskviterpenski ugljikovodici ( $\gamma$ -kurkumen, *Ar*-kurkumen, monoterpenski ugljikovodici ( $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -fenchen i limonen) i monoterpenski ester neril-acetat.

Rak je zloćudna bolest čije se stanice nekontrolirano šire i prodiru u druga tkiva. Najčešće se javlja nakon 50 godine života, a može biti uzrokovan životnim navikama.

Citotoksična aktivnost ispitana je pomoću MTT testa. MTT test se izvodi na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica. Dimetil-sulfoksid korišten je za otapanje čistih kemijskih spojeva (linalola,  $\alpha$ -terpineola, terpinen-4-ola, nerola i nerolidola) za pripremu osnovnih otopina. Ispitivanje je provedeno na staničnoj liniji raka dojke (MDA-MB-23) te na staničnoj liniji humanog dermalnog fibroblasta (HDF).<sup>1</sup>

# 1. OPĆI DIO

## 1.1 Eterična ulja

Eterična ulja su smjese velikog broja različitih kemijskih spojeva, koja nastaju kao sekundarni metaboliti aromatičnih biljaka. Eterična su ulja tekuća, u većini slučajeva nisu obojena te su topljiva u organskim otapalima, najčešće su manje gustoće od vode. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja određen je GC-MS tehnikom. Utvrđeno je da eterično ulje smilja ima vrlo bogat sastav u kojem najviše ima neril-acetata i nerola, također sadrži i italidione koji pomažu kod apsorpcije hematoma i regeneracije tkiva. Eterično ulje smilja ima protuupalno djelovanje i koristi se za liječenje opekline, ekcema, ublažava alergijske reakcije. Koristi se kod bolnih mišica i reume te potiče organe za detoksikaciju.

## 1.2 Smilje (*Helichrysum italicum*)

Smilje, (Slika 1 i 2), je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice Asteraceae. Podrijetlom je iz mediteranske regije, a postoje nalazišta u Africi i Americi. Raste kao 30-70 cm visok grm ili podgrm. Stabljike su uspravne, lisnate i obrasle dlačicama. Donji i srednji listovi su izduženi, linearni, tupog vrha, dlakavi, s gornje su strane zeleni, a s donje srebrenasti. Gornja strana listova rijetko je žljezdasta, dok je donja strana tomentozna i žljezdasta.<sup>2,3</sup> U Hrvatskoj *Helichrysum italicum* raste uz jadransku obalu, na otocima i u dalmatinskoj zagori. Ova kserofitna biljka raste u suhim, pjeskovitim i kamenitim područjima.<sup>4,5,6</sup> Smilje je biljna vrsta koja se koristi u medicini i prehrambenoj industriji kao prirodni konzervans te kao začini hrani i pićima. Posjeduje različita biološka djelovanja kao što su antioksidacijsko i antibakterijsko djelovanje.



*Slika 1. Smilje*



*Slika 2. Cvat smilja*

### 1.3 Izolacija eteričnog ulja destilacijom

Destilacija je postupak kod koje se zagrijana tekućina prevodi u paru, a nastala se para odvodi i hlađenjem ukapljuje. Kondenzat se sakuplja u drugu posudu.<sup>9</sup>

#### 1.3.1 Vodena destilacija

Vodena destilacija je najčešće korišten postupak za odvajanje hlapljivih spojeva, poput eteričnih ulja, pomoću vode i topline. Uobičajene laboratorijska aparatura za izolaciju eteričnih ulja hidrodestilacijom je aparatura prema Clevengeru (Slika 3). Clevengerova



aparatura omogućuje izdvajanje eteričnih ulja iz biljnih materijala na jednostavan način. Ova se metoda često koristi u laboratorijima i industriji za dobivanje visokokvalitetnih eteričnih ulja. Postupak destilacije po aparaturi po Clevengeru: prethodno pripremljen biljni materijal postavlja se u tikvicu u kojoj se nalazi voda i zagrijava do vrenja. Kad voda proključa destilat se skuplja u tikvicu. Destilat sadrži vodu i eterično ulje koje pliva na površini vode te se lako može odvojiti.



*Slika 3. Aparatura po Clevengeru*

### 1.3.2 Vodeno-parna destilacija

Destilacija vodenom parom primjenjuje se za izolaciju tvari iz smjese i čišćenje organskih tvari visokog vrelišta. Vodeno-parna destilacija pogodna je za čišćenje i izolaciju tvari koji se raspadaju na temperaturi vrelišta npr. izolacija eteričnog ulja smilja, kadulje ili izolacija nekih tvari koji su prisutni u niskoj koncentraciji u smjesi nehlapljivih spojeva. Mrežica s biljnim materijalom nalazi se iznad sloja vode koja ključa. Vodena para prolazi kroz biljni materijal i nosi kapljice eteričnog ulja. U cijevi koja je hlađena vodom odvija se kondenzacija vode i eteričnog ulja. Pošto ulje nije topivo u vodi, prilikom skupljanja vode i eteričnog ulja stvara se sloj eteričnog ulja i vode. Eterično ulje pliva po površini vode ako je lakše od vode, a svako ulje nije lakše od vode kao na primjer eterično ulje

klinčića. Voda je nusprodukt kojeg je potrebno ukloniti jer čini eterično ulje nesigurnim, nestabilnim te smanjuje određivanje olfaktornih osobina.

Uređaj za parnu destilaciju sastoji se od: generatora pare, kotla za destilaciju (u njemu se nalazi biljni materijal kroz koji prolazi vodena para), kondenzatora (u njega se hlađenjem ukapljuje vodena para i eterično ulje), separatora (u njemu se odvaja eterično ulje i voda).

Vodena se para proizvodi u generatoru pare, a potom se odvodi u kotao gdje se nalazi biljni materijal kroz koji prolazi para. Vodena para prolaskom kroz biljnu masu, u kojoj se nalazi eterično ulje, iz nje izvlači hlapljive komponente koje dalje s vodenom parom stvaraju smjesu. Smjesa vodene pare i hlapljivih komponenata iz biljne mase prolazi kroz hladilo te se kondenzira. Kako su eterična ulja netopljiva u vodi, hlađenjem i kondenzacijom smjesa, para, voda i ulje se međusobno odvoje. Najveće količine eteričnog ulja nastaju na početku procesa destilacije, koje se sastoji od hlapljivih spojeva, a daljnjom destilacijom nastaju manje količine ulja koje imaju karakterističan miris i sadrže ljekovite spojeve, zbog čega se ulja i koriste. Nakon odvajanja vode i eteričnog ulja, smjesa izlazi u posudu u kojoj se voda i eterično ulje odvajaju zbog razlike u gustoći. Hidrolat (vodena otopina zasićena sastavnicama eteričnog ulja) izdvaja se u donjem dijelu posude u kojem ostaju otopljene manje količine mirisnih tvari, a eterično ulje pliva na površini hidrolata.<sup>10-12</sup>

#### 1.4 Kemijski sastav eteričnog ulja smilja

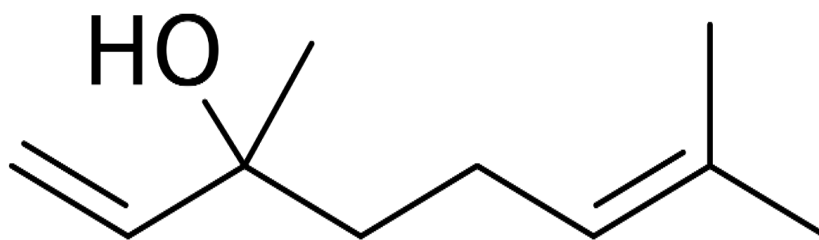
Kemijski sastav eteričnog ulja smilja ovisi o utjecaju zemljopisnog podrijetlu čimbenika okoliša, faza rasta i genotipa. Nadzemni dijelovi *Helichrysum italicum* ubrani su u Vitini i podvrgnuti su hidrodestilaciji u aparaturi po Clevengeru. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja analizira se pomoću GC-MS analize. Identificirani su različiti kemijski spojevi u različitim uzorcima, koji čine (80,28 - 99,99)% ulja. Seskviterpeni su najzastupljeniji tijekom ljetnih mjeseci nakon cvatnje, dok su monoterpeni najzastupljeniji tijekom vegetativnog razdoblja. Glavni sastojak eteričnog ulja smilja je neril-acetat. Veći sadržaj neril-acetata u odnosu na  $\alpha$ -pinen ukazuje na visoku kvalitetu eteričnog ulja smilja. Ostali terpenski spojevi pronađeni u svi uzorcima su limonen,  $\beta$ -selinen,  $\alpha$ -kompanen, italicen, izoitalicen koji može prijeći u  $\alpha$ -kurkumen .

## 1.5 Terpeni

Terpeni su jedni od hlapljivih spojeva od kojih uglavnom potječe miris biljaka i cvijeća. Prirodni su i organski spojevi koji imaju različitu strukturu te se nalaze u biljkama, gljivama, životinjama. Naziv „terpeni“ su dobili po spojevima izoliranim iz terpentina, hlapljive tekućine borova drveta. Dije se prema broju sastavnih jedinica monoterpen (10 C atoma), diterpeni (20 C atoma), seskviterpeni (15 C atoma), triterpeni (30 C atoma). Sastoje se od izoprenskih jedinica koje su sastavljene od pet ugljikovih atoma. Izoliraju se vodeno parnom destilacijom iz biljnog materijala koji sadržava mirisna esencijalna ulja (ulja dobivena iz esencije biljaka). Terpenoidi imaju različite biološke funkcije. Neki su terpenoidi odgovorni za mirise i arome biljaka, dok drugi djeluju kao pesticidi tako da štite biljke od napada insekata, privlače oprašivače, komuniciraju među organizmima. Terpenoidi igraju ključnu ulogu u fotosintezi jer su sastavni dijelovi klorofila. Terpenoidi su osnovni sastojci eteričnih ulja, koja su koncentrirani ekstrakti iz biljaka sa specifičnim aromama i svojstvima. Neki od njih su od medicinskog značaja, mentol se koristi za ublažavanje simptoma kašlja i prehlade.

### 1.5.1 Linalol

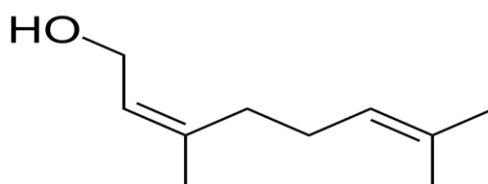
Linalol (3,7-dimetilokta-1,6-dien-1-ol), (Slika 4), je monoterpenski alkohol s molekulskom formulom  $C_{10}H_{18}O$ . Postoje dva enantiomera linalola, a to su (S i R) linalol. (S) linalol je glavni sastojak eteričnog ulja korijandera, slatke naranče, cvijeća, dok je (R) linalol prisutan u lavandi, smilju, lovoru, slatkom bosiljku. Nalazi se u mnogim biljkama, cvjetovima, citrusnom voću, lavandi, ružmarinu, bosiljku. Dobiva se iz ekstrakta biljka ružmarina, lavande, bosiljka. Ima opuštajući i smirujući efekt pa se zbog toga koristi u aromaterapiji. Koristi se u proizvodnji sapuna, mirisa, prehrambenih aditiva kao aroma, proizvoda za kućanstvo i insekticida. Inhalacija linalolom pomaže smanjenju stresa, anksioznosti te poboljšanju raspoloženja. Linalol djeluje kao prirodni insekticid i antiseptik pa djeluje korisno za zaštitu biljaka od štetočina, kao sastojak u dezinfekcijskom sredstvu. Ima složena svojstva mirisa koja su slična cvjetnom, začinskom i nalikuju na francusku lavandu i okusa poput citrusa slatkog s pikantnim tropskim naglaskom.<sup>13-15</sup>



Slika 4. Strukturna formula linalola

### 1.5.2 Nerol

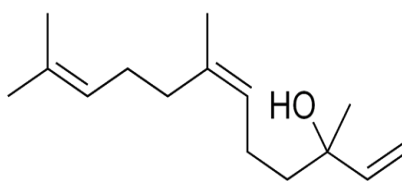
Nerol (3,7-dimetilokta-2,6-dien-1-ol) (Slika 5), je monoterpenski alkohol s molekulskom formulom  $C_{10}H_{18}O$ . Bezbojna uljasta tekućina. Koristi se kao osnova za proizvodnju parfema i mirisa. Nalazi se u mnogi eterični uljima poput limunske trave i hmelja. Izoliran je iz nerolija i otud dolazi njegovo ime. Nerol je gorkog okusa, temperature vrelišta  $225\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperature tališta  $118\text{ }^{\circ}\text{C}$ , plamište mu iznosi  $107,78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Netopljiv je u vodi, topiv u klorofmormu, etanolu, eteru, većini fiksirani ulja. Piroliza  $\beta$ -pinena daje mircen, koji se pretvara u smjesu geranil, neril i linalil klorida dodavanjem klorovodika u prisutnosti malih količina katalizatora npr. bakrova(I)klorida i organske kvaterne amonijeve soli. Nakon što se ukloni katalizator, smjesa reagira s natrijevim acetatom u prisutnosti dušične baze i pretvara se u geranil acetat, neril acetat i manju količinu linalil acetata. Nakon saponifikacije i frakcijskom destilacijom dobivenih alkohola dobiva se frakcija geraniola. Nerol se s geraniolom proizvodi iz miricena, a nerol se od geraniola odvaja frakcijskom destilacijom.<sup>16-18</sup>



Slika 5. Strukturna formula nerola

### 1.5.3 Nerolidol

Nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodekatrien-3-ol), (Slika 6), koji se još naziva peruviol, prirodno je rasprostranjen seskviterpenski alkohol koji se nalazi u raznim biljkama cvjetnog mirisa. Nerolidol je tekućina koja ima prozirno blijedu, žutu boju s nježnim cvjetnim mirisom koji podsjeća na jabuke i ruže. Izolira se kao među-produkt u sintezi (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatriena (DMNT), hlapljivog spoja koja štiti biljku od štete nanesene biljojedima. Nerolidol postoji u dva izomera, *trans* i *cis* oblik, i koristi se u raznim industrijama. Posebno se koristi u kozmetičkoj industriji (šamponi, parfemi, deterdženti). Pošto se nalazi u mnogim proizvodima to je privuklo mnoge istraživače da istraže medicinska svojstva nerolidola koja bi mogla imati korisne učinke na ljudsko zdravlje. Vrlo je hidrofoban pa se teško otapa u vodi i sličnim polarnim otapalima. Temperatura taljenja mu je veća od 100 °C, a temperatura vrenja iznosi 276 °C. Nerolidol ima važnu ulogu u obrambenom sustavu nekih biljaka. Dokazalo se da nerolidol ima antimikrobno, antioksidativno, antibiofilmno, antiparazitsko, antinocepitivno i protuupalno djelovanje.<sup>8</sup> Među alternativnim pristupima, fitokemikalije poput nerolidola se sve više istražuju zbog svojih potencijalno pogodnih učinaka na stanice raka *in vitro* i *in vivo*. Nerolidol utječe na zdrave i kancerogene ljudske stanice što je eksperimentalno dokazano. Stanice raka su podložnije utjecaju nerolidola od zdravih stanica, gdje mu je važna uloga u antitumornim istraživanjima.<sup>19-23</sup>

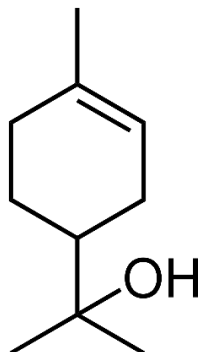


Slika 6. Struktura nerolidola

### 1.5.4 Terpeneol

Terpeneol (2-(4-metilcikloheksan-3-en-1-il)propan-2-ol) (Slika 7) prirodni je monoterpenski alkohol s molekulskom formulom C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O. Nalazi se u esencijalnim uljima, uključujući ulja četinara poput borovine i čempresa. Svježeg je, cvjetnog i blago citrusnog mirisa. Terpeneol posjeduje antiseptička i antimikrobna svojstva. Koristi se u

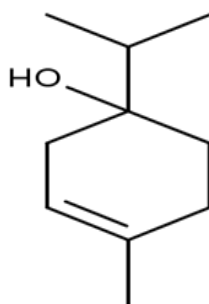
kozmetičkoj, parfemskoj, industriji boja, lakova, dezodoransa, sapuna. Postoji nekoliko vrsta izomera terpineola,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -terpineol i  $\gamma$ -terpineol.  $\alpha$ -terpineol prirodni je proizvod pronađen u *Nepeta nepetella* te u *Xylopija aromatica*.<sup>24-26</sup>



Slika 7. Strukturna formula  $\alpha$ -terpineola

### 1.5.5 Terpinen-4-ol

Terpinen-4-ol (4-metil-1-propan-2-cikloheksan-3-en-1-ol) (Slika 8) je izomer terpineola molekulske formule  $C_{10}H_{18}O$ . Pronađen je u *Myrtus communis*, *Cinnamomum camphora* i drugim organizmima. Primarni sastojak ulja čajevca koji se dobiva kao ekstrakt lišća, grana i kore biljke *Melaleuca alternifolia* Cheel. Drvo ulja čajevca otporno je na truljenje. Terpinen-4-ol ima puno bioloških aktivnosti. Terpinen-4-ol ima ulogu u kontroli i održavanju arterijskog krvnog tlaka.<sup>27-29</sup>



Slika 8. Strukturna formula terpinen-4-ol

## 1.6 Biološka aktivnost

Biološka aktivnost smilja izrazito je široka, koristi se u medicini, prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Brojnim istraživanjima dokazano je kako ima protuupalno, antioksidacijsko, antimikrobno, insekticidno djelovanje...

### 1.6.1 Protuupalno djelovanje

Upalni procesi mogu uzrokovati neke bolesti, kao što su astma, ateroskleroze, karcinom. Prostaglandini i leukotrijeni koji se nazivaju kemijskim posrednicima upale su kemijske tvari koje nastaju i koje se izlučuju tijekom upale. Smilje ima izraženo protuupalno djelovanje, a ključni faktori koji doprinose njegovu protuupalnom djelovanju su spojevi poput acetat-nerola i  $\alpha$ -bisabola u eteričnom ulju. Inhibira upalne procese na način da inhibira aktivnost enzima i molekula koje izazivaju upalne procese.

### 1.6.2 Antimikrobno djelovanje

Antimikrobno djelovanje smilja očituje se u borbi protiv različitih mikroorganizama, uključujući bakterije, gljivice i viruse. Spojevi poput monoterpenskih alkohola geraniola, nerola i acetatnih estera su odgovorni za antimikrobno djelovanje eteričnog ulja smilja. Antimikrobno djelovanje provodi na Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Dokazano je da Gram-pozitivne bakterije posjeduju bolje antimikrobno djelovanje od Gram-negativnih, zbog njihove drugačije građe staničnog zida. Gram-pozitivne bakterije sadrže stanični zid koji je građen od citoplazmatske membrane i sloja peptidoglikana pa stoga nisu jaka barijera pri prolasku lipofilnih molekula, koje su odgovorne za antimikrobno djelovanje. Gram-negativne bakterije sadrže stanični zid građen od citoplazmatske membrane, sloja peptidoglikana i vanjske fosfolipidne membrane koju sačinjavaju lipopolisaharidi.

### 1.6.3 Antioksidacijsko djelovanje

Smilje ima izraženo antioksidacijsko djelovanje, što znači da biljka sadrži spojeve koji pomažu u neutralizaciji slobodnih radikala u tijelu. Slobodni radikali mogu uzrokovati oksidativni stres i oštetiti stanice, zbog čega mogu nastati različiti zdravstveni problemi. Smilje sadržava antioksidanse kao što su flavonoidi, fenolne spojeve te dr. fitokemikalije koje pomažu u borbi protiv oksidativnog stresa. Ovo se antioksidacijsko svojstvo smilja često koristi u kozmetičkim proizvodima i aromaterapiji za njegovanje kože te poticanje općeg zdravlja.<sup>30</sup>

### 1.7 Citotoksičnost

Kemijski spoj koji prilikom izvođenja testa citotoksične aktivnosti uzrokuje staničnu smrt naziva se citotoksin. Citotoksini posjeduju reverzibilan i ireverzibilan učinak na stanicu koji se može vidjeti odmah ili u rasponu od nekoliko tjedana. Učinci citotoksina, koji su uočeni promatranjem stanica nekim od načina, objašnjavaju se fizikalno-kemijskim promjenama. Neki od načina promatranja stanica su: farmaceutski citotoksin može imati blagi trenutni učinak, ali i progresivan učinak nakon metaboliziranja, neki citotoksini mogu prouzročiti gubitak reproduktivnog potencijala. Stanice kod kojih je došlo do nepovoljne fizikalno-kemijske promjene, zbog ireverzibilnog oštećenja, u velikom broju slučajeva će odumrijeti. Postoje razni testovi za provjeru citotoksične aktivnosti koji se međusobno razlikuju po staničnom mehanizmu te po dobivenim rezultatima.<sup>31</sup>

### 1.8 Kromatografija

Prve kromatografske eksperimente izveo je ruski botaničar i biokemičar Mihail Semjovič Cvet. On je svojim prvim kromatografskim eksperimentom razdvojio različite obojene pigmente iz biljnih ekstrakata. Staklenu kolonu napunio je smrvljenim kalcijevim karbonatom koji se služio kao stacionarna faza, a mobilna faza je bio eter. Dodatkom mobilne faze pigmenti biljaka razdvajali su se u obojene vrpce što je bio rezultat različitog afiniteta prema stacionarnoj fazi. Kromatografija je tehnika odjeljivanja komponenata smjese na temelju različite raspodjele komponenata između dviju faza, mobilne i



stacionarne. Raspodjela komponenata između mobilne i stacionarne faze temelji se na različitom afinitetu komponenata smjese prema fazama. Komponenta koja ima manji afinitet, prema stacionarnoj fazi kraće se zadržavaju na njoj, odnosno brže putuju mobilnom fazom. Osnovna podjela kromatografije prema načinu ostvarivanja kontakta između stacionarne i mobilne faze je na plošnu (primjer papirna kromatografija) i kolonsku kromatografiju (primjer tekućinska i plinska kromatografija). Podjela kromatografije s obzirom na agregatno stanje mobilne faze: plinska i tekućinska kromatografija. Mobilna faza kod plinske kromatografije je inertni plin (argon, ugljikov dioksid, helij, dušik), a stacionarna faza nehlapljiva tekućina nanešena na kruti nosač. Mobilna faza kod tekućinske kromatografije je tekućina male viskoznosti. Kromatografske tehnike možemo podijeliti s obzirom na prirodu ravnoteže između stacionarne i mobilne faze, na razdjelnu, adsorpcijsku, afinitetnu, kromatografiju isključenjem i kromatografiju ionskom izmjenom.

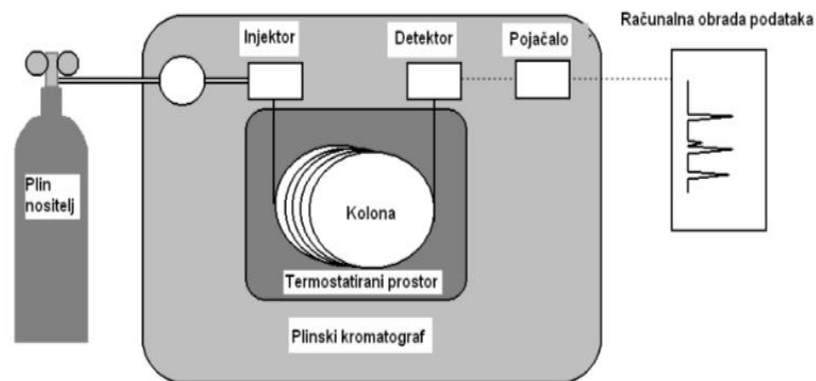
### 1.8.1 Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija je analitička tehnika za odjeljivanje smjesa hlapljivih spojeva i analizu manje hlapljivih spojeva pr. alkoholi, ugljikovodici. Najviše se promjenjuje u organskoj kemiji. Uzorci kod plinske kromatografije moraju biti hlapljivi kako bi isparili u injektoru. Mobilna faza je inertni plin, a stacionarna faza je nehlapljiva tekućina. Uzorak se brzo injektira kroz gumenu pregradu u kolonu. Detektor, kolona i mjesto za injektiranje uzorka zagrijani su na malo više temperature nego li kromatografska kolona s razlogom da se osigura brzo uplinjavanje uzorka pri injektiranju i spriječi kondenzacija dolaskom na detektor. Volumen injektiranih uzoraka u plinovitom stanju kreće se od (1-10)  $\mu\text{L}$ , dok se volumen uzorka u tekućem stanju kreće od (0,1-1)  $\mu\text{L}$ .

Plinski kromatograf (Slika 9)<sup>32</sup> je uređaj za plinsku kromatografiju. Sastoji se od plina nositelja s regulatorom tlaka i mjeračem protoka, injekcijskog bloka, kolone koja se nalazi u termostatiranom prostoru, pojačala, detektora i računala. Uzorak koji brzo ispari unosi se u injektor. Komponente uzorka koje se eluiraju s kolone određuju se na detektoru. Na temelju zapisa detektora moguće je kvalitativno i kvantitativno odrediti o kojem je spoju riječ. Detektori ne signaliziraju što je izišlo iz kolone nego samo signaliziraju da je nešto napustilo kolonu.

## Podjela detektora :

- **Detektor toplinske vodljivosti**- temelji se na promjeni toplinske vodljivosti struje plina nositelja koja nastaje zbog prisutnosti analita
- **Plamenoionizacijski detektor**- velika osjetljivost, široko područje linearnog odziva
- **Detektor apsorpcije elektrona**- osjetljiv na elektronegativne funkcionalne skupine (halogeni, peroksidi), a neosjetljiv na amine, alkohole
- **Selektivni detektor**- povezane ili kombinirane tehnike s detektorima na bazi spektroskopije<sup>33-37</sup>



Slika 9. Shematski prikaz plinskog kromatografa

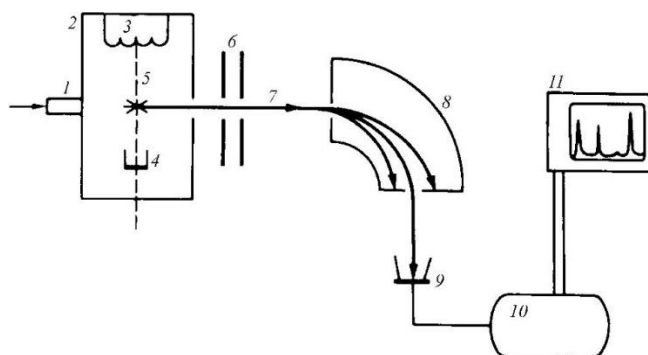
Postoje još detektori za kvalitativnu identifikaciju analita, a oni su

- **Maseni spektrometar**
- **Infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom**

## Maseni spektrometar:

Maseni spektrometar (Slika 10)<sup>38</sup> se sastoji od analizatora i detektora u kojima se formiraju ioni. Najčešće korišten analizator je kvadrupol, a sastoji se od četiri elektrode, jedan par elektroda ima pozitivan, a drugi par negativan polaritet. Elektrode su spojene radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje. U odnosu na omjer mase i naboja, ovisno o vrsti/količini primijenjene struje i polja, samo ion koji ima određen omjer mase

i naboja može zadržati stalnu putanju i proći između elektroda, da se neutralizira te snime na detektoru. Ioni koji ne zadržavaju stalnu putanju diraju elektrode i postaju neutralne molekule. Zbog velikih brzina snimanja kvadrupolni analizator je pogodan za upotrebu u kromatografiji.<sup>39</sup>



*Slika 10. Shematski prikaz masenog spektrometra*

Ulazni sustav (1), ionski izvor (2), katoda (3), anoda (4), elektronski snop (5), električno polje (6), ionski snop (7), magnetsko polje (8), detektor (9), elektronička obradba signala (10), zapis spektra (11)

### 1.8.2 Plinska kromatografija spektrometrija masa (GC-MS)

GC-MS je analitička tehnika koja se koristi plinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom za određivanje tvari u nekom uzorku. Veza između plinske kromatografije i spektrometrije masa povećava njihovu pojedinačnu specifičnost i osjetljivost čime omogućuje analitičkom kemičaru da istodobno kvalitativno i kvantitativno odredi otopinu koja sadrži veliki broj različitih spojeva. Smatra se zlatnim standardom jer uspješno kvalitativno i kvantitativno analizira biološke uzorke, sredstva ovisnosti, otrove. Bez sinergijskog djelovanja ovih dviju metoda nije moguće odrediti molekule koje se nalaze u uzorku.



*Slika 11. Uređaj za GC-MS analizu*

Uređaj za GC-MS (Slika 11)<sup>40</sup>. analizu sastoji se od dva osnovna dijela od masenog spektrometra i uređaja za plinsku kromatografiju. Mogu biti povezani otvorenim i direktnim spojem. Uzorak se injektira u plinski kromatogram pri čemu se prevodi u plinovito stanje. Do stacionarne faze putuje strujom mobilne faze i tako najbrže reagira sa stacionarno fazom. Za stacionarnu fazu svaka se komponenta vezuje različitom brzinom. One koje su najbrže reagiraju sa stacionarnom fazom i prve eluiraju iz kolone. Nakon što sve komponente eluiraju iz kolone idu prema detektoru i stvaraju elektronski signal.

## 1.9 Rak

Rak (novotvorina/tumor ) je zloćudna bolest čije se stanice nekontrolirano šire i prodiru u druga tkiva i čitavo tijelo preko krvožilnog sustava. Nastaje zbog poremećaja proliferacije stanica. Najvažnija stvar je razlikovati vrste raka, a one su benigne (dobroćudni) i maligne (zloćudni). Dobroćudni i zloćudni tumori se klasificiraju prema vrsti stanica iz kojih nastaju, a to su karcinomi, sarkomi, leukemija i limfomi. Tumori se još klasificiraju prema vrsti tkiva iz kojeg nastaju (rak dojke ili debelog crijeva) i vrsti zahvaćenih stanica. Najčešće vrste raka od kojih ljudi obolijevaju su rak prostate, dojke, debelog crijeva te raka pluća.

Benigni tumor ostaje ograničen na mjestu na kojem je nastao ne širi se na ostala zdrava tkiva ni na dijelove tijela. Uklanjaju se kirurški i nisu potrebne daljnje metode liječenja poput kemoterapija.

Maligni tumor se širi na okolna zdrava tkiva i zdrave dijelove tijela putem krvožilnog sustava ili limfatičkog sustava (metastaza). U većini slučajeva zbog njihove brze sposobnosti širenja na udaljene dijelove tijela ne mogu se samo kirurški ukloniti već su potrebne drugačije metode liječenja poput kemoterapija, zračenja.

Karcinom je zloćudna bolest epitelnih stanica na koju otpada oko 90% slučajeva raka.

Sarkomi su tumori vezivnih tkiva poput mišića, hrskavice i veziva.

Leukemija i limfomi, nastaju iz krvotvornih stanica i iz stanica imunostava na njih otpada oko 8%.<sup>41</sup>

### 1.9.1 Rak dojke

Rak dojke je najčešći uzrok smrti kod žena. Uzroci nastanka raka su različiti kao na primjer stil života, reproduktivno ponašanje, genetički čimbenici. Kako bi smanjili mogućnost nastanka raka dojke trebamo promijeniti način života, tako da smanjimo tjelesnu težinu, povećamo fizičku aktivnost, zdravije se hranimo, redovito odlazimo na preglede te vršimo samokontrolu.<sup>42</sup>

## 1.10 Stanične linije

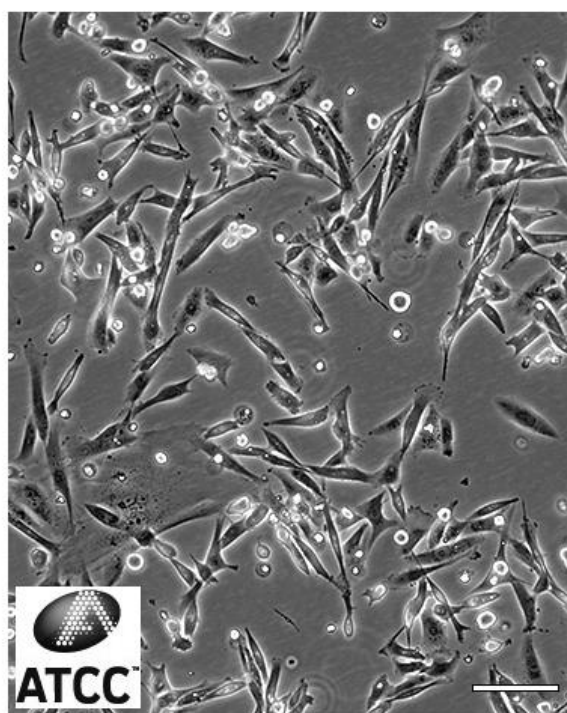
### 1.10.1 Stanična linija raka dojke MDA-MB-231

MDA-MB-231, čije su karakteristike dane u Tablici 1, je stanica slična epitelu (Slika 12)<sup>43</sup> koja je izolirana iz mliječne žlijezde 50-godišnje bijele žene s adenokarcinomom. Stanična linija je aneuploidna ženska s prosječnim brojem kromosoma 64, a broj kromosoma u stanici je između 52 i 68. Kromosomi N8 i N15 su bili odsutni.<sup>44</sup>

Tablica 1. Karakteristika stanične linije MDA-MB-231

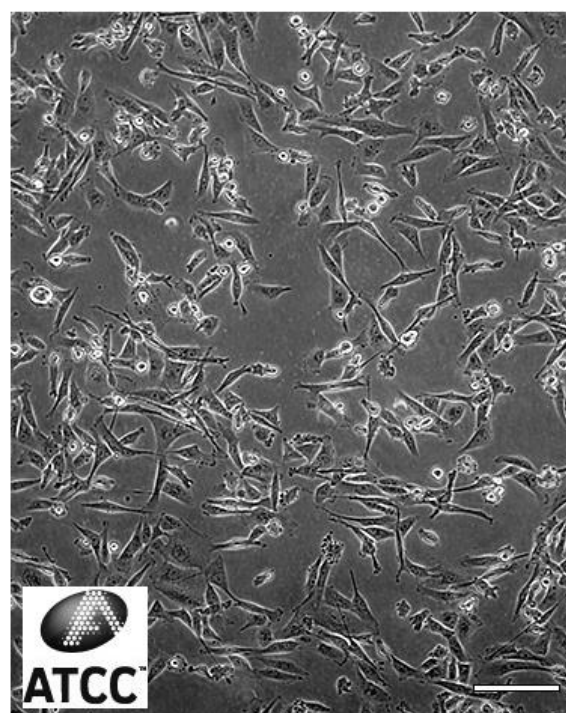
Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tip stanice	Epitelne
Morfologija	Epitelna
Tkivo	Dojka, mliječna žlijezda, pleularni izljev
Bolest	Adenokarcinom
Uvjeti čuvanja	Parna faza tekućeg dušika
Tip rasta	Adherentan
Kariotip	Aneuploidni ženski (modalni broj kromosoma = 64)

ATCC Number: **HTB-26**™  
 Designation: **MDA-MB-231**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Slika 12. Stanična linija MDA-MB-231

### 1.11 Stanična linija ljudskog dermalnog fibroblasta (HDF)

HDF, čije su karakteristike dane u Tablici 2, je stanična linija ljudskog dermalnog fibroblasta izolirana iz ljudske kože. Koristi se u istraživačke svrhe kako bi otkrili razlog starenja kože, kožnih bolesti.<sup>45</sup>

*Tablica 2. Karakteristike stanične linije ljudskog dermalnog fibroblasta*

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tip stanice	Fibroblast
Morfologija	Vretenastog oblika,
Tkivo	Koža
Uvjeti čuvanja	Parna faza

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1 Sakupljanje samoniklog bilja

Biljni materijal sačinjen od samoniklih biljaka *H. italicum* sakupljen je s njihovih prirodnih staništa (Tablica 3) u skladu sa zakonskim i botaničkim propisima za branje samoniklih biljaka na području Vitine.

Tablica 3. Mjesto uzorkovanja smilja

Lokacija	Zemljopisna širina	Zemljopisna dužina	Nadmorska visina
Vitina (VI)	43°14'19''	17°28'52''	174 m

Prilikom branja bilja bilo za komercijalne ili osobne svrhe treba poštivati osnovna pravila kako bi dobili što kvalitetnije eterično ulje te kako bi bolje odredili njegovu kemijsku analizu. Na prirodnom staništu na kojem biljke samoniklo rastu, beru se samo poznate biljne vrste. Prilikom sakupljanja bilja treba biti pažljiv kako nebi uzrokovali potpuno izumiranje biljne vrste. Sakupljanjem veće količine bilja za potrebe trgovine, na jednom staništu ostavlja se trećina bilja da se vrsta obnovi. Problem tijekom branja bilja je taj što biljka različito izgleda tijekom godišnjih doba, da bi uspješno identificirali bilje trebamo ga promatrati tijekom razvoja i izvan vegetacijskog razdoblja. Na kvalitetu ubranog bilja utječe vrijeme sakupljanja određene biljne vrste. Vrijeme sakupljanja bilja nije definirano, ovisi o biljnoj vrsti, godišnjem dobu, klimatskim uvjet. ima, nadmorskoj visini. Samoniklo bilje sakuplja se po suhom i sunčanom vremenu sredinom dana. Zbog prisutnosti vlage na biljkama i prodiranju vode u unutrašnje dijelove biljke može doći do hidrolize prirodnih organskih spojeva s polarnim funkcijskim skupinama, što uzrokuje određene gubitke tijekom izolacije. Ako je prije sakupljanja bilja padala kiša bilje treba ostaviti da se osuši prirodnim putem te da se ponovo sintetiziraju oni spojevi koji su se razgradili hidrolizom. Ne beru se zaprašene, blatnjave, ni bolesne biljke. Ubrano bilje se do mjesta sušenja sprema u košare ili vreće. Preporučuje se da se bilje suši u šupljikavoj ambalaži da bi se omogućio što veći protok zraka, a samim time ubrzalo sušenje.<sup>46</sup>



## 2.2 Sušenje biljnog materijala

Skupljeno bilje je vrlo važno dobro osušiti jer voda koja se u njemu nalazi uzrokuje rast mikroorganizama i potiče enzimsku aktivnost čime dolazi do gubitka aktivnih sastojaka i prirodnih organskih spojeva od kojih se sastoji eterično ulje. Nedugo nakon što smo ubrali bilje treba ga što prije osušiti. Biljni materijal je sušen na zraku 15 dana i nakon toga na sobnoj temperaturi u tami.

### **Prvi dan**

Listovi, stabljike i cvjetovi *H. italicum* fiksirani su u standardnoj otopini od 25mM fosfatnog pufera (pH=7) s 3% otopinom glutaraldehida i 0,001% Tween 20 za promatranje epidermalne površine. Uzorci su stavljeni u otopinu 25 mM fosfatnog pufera s 3% otopinom glutaraldehida za fiksiranje bez Tween 20. FAA(formalin acetoacid-etil alkohol) fiksativ koji se je koristio u ispitivanju sastoji se od 50% etanola, 35% destilirane vode, 10% formaaldehida i 5% ledene octene kiseline.

### **Drugi dan**

Uzorci koji su stajali cijelu noć na 4 °C isprani su tri puta fosfatnim puferom u intervalima od 10 minuta čime se uklanja glutaraldehid koji nije reagirao s proteinima i drugim molekulama koje se nalaze na površini biljnog tkiva. Nakon tog pripreme se otopine etanola (30%, 50%, 70% i 95%) u čemu se uzorak dehidrira. Dehidrirani uzorak ostavi se u apsolutnom etanolu preko noći na 44 °C.

### **Treći dan**

Uzorak koji se dehidrirao prenosi se u uređaj za sušenje pri određeni uvjetima na kojima se uklanja zaostala voda i apsolutni etanol. Uzorak je unesen na uređaj za nanošenje tankog sloja zlata debljine 10 nm. Kad se nanese zlato uzorak se promatra elektronskim mikroskopom SEM (Tescana Mira 3).<sup>47</sup>

## 2.3 Analiza eteričnog ulja

Pomoću GC-MS tehnike određen je kemijski sastav eteričnog ulja smilja. Uzorak je preveden u plinovito stanje u injektoru pri temperaturi od 250°C i iz injektora odlazi u

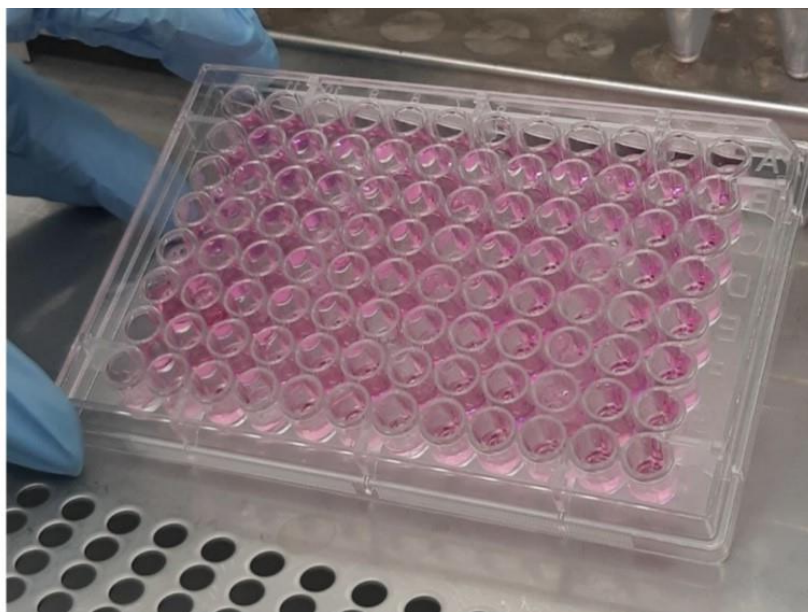
kromatografsku kolonu. Napolarna kapilarna kolona koja ima stacionarnu fazu načinjenu od 5% fenil-metilpoliksana ( $30\text{ m} \cdot 0,25\text{ mm}$ , debljine sloja  $453 \cdot 0,25\text{ m}$ ). Helij je korišten kao plin nosač s protokom  $1\text{ mL/min}$ . Temperatura peći u kojoj se nalazi kromatografska kolona postavljena je da bude izotermna 3 min na  $70^\circ\text{C}$ , a zatim je povećana na  $200^\circ\text{C}$  brzinom od  $3^\circ\text{C/min}$  i održavana 20 min na  $200^\circ\text{C}$ . Maseni detektor ima temperaturu od  $280^\circ\text{C}$ , a energija ionizacije postavljena je na 70 eV. Rezultate mjerenja zabilježilo je računalo i prikazalo u obliku pika za svaki spoj posebno.<sup>47</sup>

## 2.4 MTT

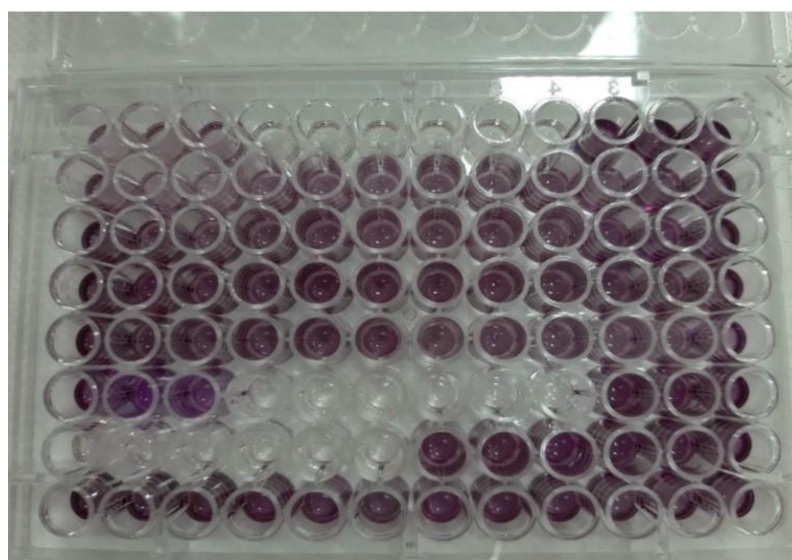
MTT je kolorimetrijski test za procjenu stanične metaboličke aktivnosti. Pod definiranim uvjetima ovisno o NAD(P)H enzimi stanične oksidoreduktaze mogu održavati broj stanica sposobnih za živo. Žutu boju MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5difeniltetrazolijev bromid) mogu reducirati enzimi stanične oksidoreduktaze u ljubičastu boju netopljivog formazana. Netopljivi formazan se otapa pomoću dimetil-sulfoksida (DMSO). MTT test se izvodi na pločici s 96 jažica.<sup>48</sup>

### **POSTUPAK :**

Već pripremljene stanice raka dojke isperu se sa fosfatnim puferom i prebace se na pločicu s 96 jažica. Stanice koje smo prebacili na pločice s jažicama nadopunili smo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) i inkubirali 24 h. Nakon što se uzorak inkubirao 24 h medij smo isisali iz jažica te dodali tri ponavljana uzorka otopljen u mediju uključujući i kontrole u prve tri jažice slijepe probe (jažice koje ne sadrže uzorak). Stanice se inkubiraju u ovlaženom 5%  $\text{CO}_2$  inkubatoru na  $37^\circ\text{C}$  24, 48 i 72 h te se nakon inkubacije doda otopina MTT-a (Slika 13) te se uzorci inkubiraju još dva sata. Nakon što su se uzorci inkubirali još dva sata u MTT-u, MTT se isisa iz jažica i otopi u DMSO (dimetil-sulfoksid) (Slika 14), i mjeri se apsorbancija pri 595 nm. Nakon dobivenih rezultata izračunamo maksimalnu inhibitorску koncentraciju ( $\text{IC}_{50}$ ).  $\text{IC}_{50}$  je kvantitativna mjera koja pokazuje koliko je potrebno inhibitorске tvari za inhibiciju. Predstavlja koncentraciju koja inhibira neku aktivnost za pedeset posto.<sup>49</sup>



*Slika 13. Otopina MTT-a bez DMSO-a*



*Slika 14. Dodatak DMSO-a otopini MTT-a*

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

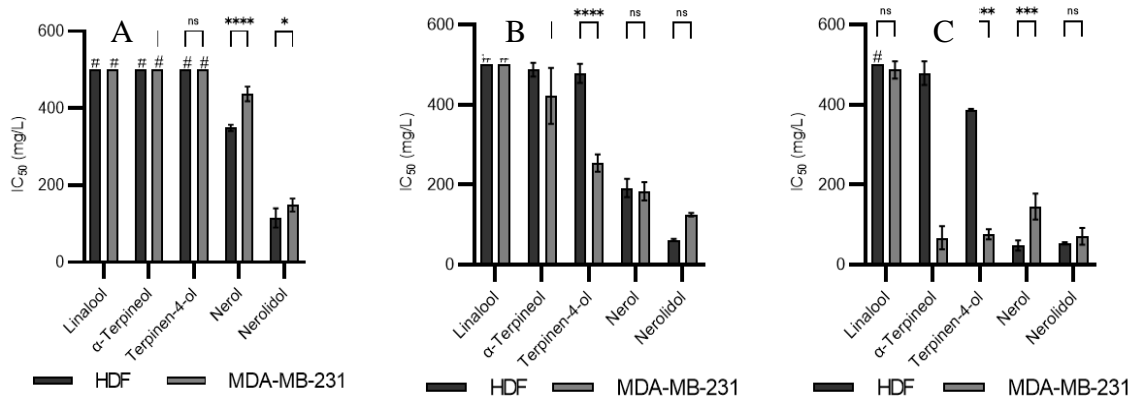
#### 3.1 Citotoksična aktivnost na staničnim linijama karcinoma dojke i stanicama dermalnog fibroblasta

Citotoksična aktivnost eteričnog ulja smilja određena je na staničnim linijama karcinoma dojke (MDA-MB-231) na pojedinačnim spojevima linalolu,  $\alpha$ -terpineolu, terpinen-4-olu, nerolu i nerolidolu. Ispitivanje citotoksičnosti provedeno je na staničnim linijama karcinoma dojke i ljudskog dermalnog fibroblasta na pojedinačnim kemijskim spojevima rastućih koncentracija i smjesama spojeva proučavanjem eteričnog ulja smilja tijekom (4, 24, 48) sati (Slika 15). Linalol nije citotoksičan za staničnu liniju ljudskog dermalnog fibroblasta, a samo je umjereno citotoksičan za staničnu liniju karcinoma dojke u vremenu od 48 sati. Linalol u visokim dozama inducira apoptozu stanične linije karcinoma dojke jer je stanična linija bila vrlo otporna na liječenje. Nerolidol izaziva staničnu smrt razbijanjem stanične membrane, čak i u malim dozama.<sup>50</sup> Također izaziva više vrsta stanične smrti ovisno o primijenjenoj koncentraciji.<sup>51</sup> Nerol,  $\alpha$ -terpineol i terpinen-4-ol pokazuju dobra vremenski ovisna smanjenja vrijednosti  $IC_{50}$  s povećanje trajanja tretmana. Nerol je bio drugi najotrovniji spoj. Stanična linija MDA-MB-231 bila je otpornija na njegove učinke. Suprotno nerolu,  $\alpha$ -terpineol i terpinen-4-ol su citotoksičniji za staničnu liniju MDA-MB-231 nego što su bili za staničnu liniju HDF. Veća citotoksičnost nerola,  $\alpha$ -terpineola i terpinen-4-ola na staničnoj liniji MDA-MB-231 se može objasniti podrijetlom stanične linije. MDA-MB-231 je tumorska stanična linija, a HDF je normalna stanična linija. Kad su stanične linije tretirane smjesom svih pet terpena (Slika 16), zbog usporedbe s pojedinačnim spojevima, pokazalo se da se za staničnu liniju HDF ovisno o vremenu smanjuje  $IC_{50}$  vrijednost, a za staničnu liniju MDA-MB-231 ne smanjuje. Stanična linija MDA-MB-231 je otpornija na smjesu spojeva u usporedbi sa staničnom linijom HDF (Tablica 4) što ukazuje na prisutnost antagonističnog učinka između spojeva koji smanjuju citotoksičnost. Za staničnu liniju HDF čisti spojevi linalol,  $\alpha$ -terpineol i terpinen-4-ol imaju viši  $IC_{50}$  od mješavine spojeva dok nerolidol ima nižu  $IC_{50}$  vrijednost. Dokazano je da smjesa nije jednako ili više citotoksična kao i najcitotoksičniji pojedinačni spoj što se vidi na primjeru nerolidola koji je u smjesi manje toksičan za stanice nego kad je sam što je izraženije na staničnoj liniji MDA-MB-231. Smjesa od pet spojeva ne smatra se toksičnom u vremenski razdobljima od 4h i 24h jer je bilo više od 500 mg/L referentnog uzorka što pokazuje antagonističko

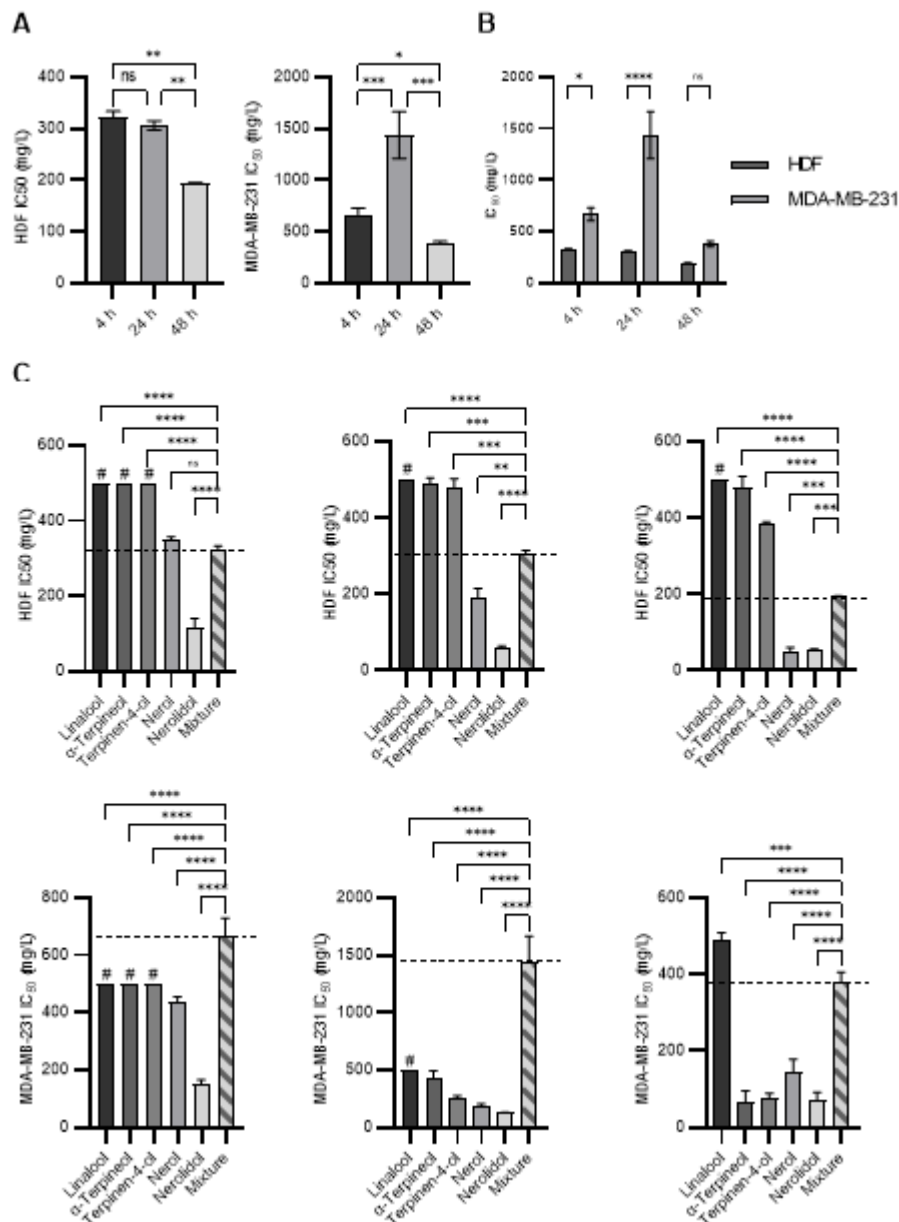
djelovanje prema citotoksičnom učinku. Ovi rezultati mogli bi objasniti zašto eterična ulja imaju tako visoke vrijednosti  $IC_{50}$  iako bi mogli biti sastavljeni od vrlo otrovnih spojeva. Ovo također potvrđuje upotrebu eteričnog ulja u narodnoj medicini, gdje se ublažava citotoksični učinak pojedinih spojeva učinkom smjese. Naši rezultati pokazuju da složene smjese poput eteričnog ulja ne utječu na stanice na temelju učinka pojedinačnih spojeva, ali da ti učinci međusobno djeluju pozitivno ili negativno jedni na druge.

Tablica 4. Procijenjene vrijednosti  $IC_{50}$  (=srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (mg/L)) nakon tretmana stanica s eteričnim uljem smilja.

Uzorak	$IC_{50}$ (HDF)	$IC_{50}$ (MDA-MB-231)
Vitina	189.63 $\pm$ 4.82	2017.33 $\pm$ 13.04



Slika 15. Usporedba  $IC_{50}$  vrijednosti pojedinačnih spojeva između dviju staničnih linija: (A) tijekom 4 h tretmana; (B) za 24 h tretmana; (C) tijekom 48 h tretmana.



Slika 16. Usporedba između smjese i pojedinačnih komponenti za HDF i MDA-MB-231 staničnu liniju. (A) Usporedba između IC<sub>50</sub> vrijednosti smjese nakon 4, 24 i 48 h tretmana za HDF i MDA-MB-231 stanične linije. (B) Usporedba između IC<sub>50</sub> vrijednosti za dvije stanične linije. (B) Usporedba između IC<sub>50</sub> vrijednosti za dvije stanične linije tretirane smjesom spojeva u različitim vremenskim točkama. (C) Usporedba IC<sub>50</sub> vrijednosti pojedinačnih spojeva s IC<sub>50</sub> vrijednošću smjesa za 4, 24 i 48-h za obje stanične linije.

### 3.2 Analiza kemijskog sastava eteričnog ulja

Kemijskom analizom eteričnog ulja smilja koje je sakupljeno na području Vitine utvrđeno je da sadrži visok udio neterpenskih spojeva (Tablica 5). čiji udio iznosi 28,59%. Detektirana su samo tri spoja  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -fenhen i limonen koji se klasificiraju kao

monoterpenski ugljikovodici i ovisno o uzorku čine (6,21-18,56)% nafte. Seskviterpenski ugljikovodici su dominantni tijekom kasnih ljetnih mjeseci nakon razdoblja cvatnje, dok su monoterpeni zastupljeniji tijekom vegetativnog razdoblja. Eterično ulje smilja koje smo dobili od uzorka sakupljenog na području Vitine sadrži veći udio neril-acetata (više od 5%), a  $\alpha$ -pinena manje od 25% što ukazuje na visoku kvalitetu dobivenog ulja.

Tablica 5. Kemijski sastav eteričnog ulja smilja

Spojevi	RI-E	RI-L	VI
$\alpha$ - pinen	940	943	8,45
$\alpha$ – fenhen	953	954	0,0
Limonen	1033	1035	1,41
1,8-cineol	1036	1036	0,00
Izobutil-angelat	1054	1055	0,57
Linaol	1100	1103	1,47
2-metilbutil-angelat	1156	1158	3,27
Borneol	1170	1171	0,00
Terpinen-4-ol	1180	1181	0,00
4,6-dimetiloktan-3,5-dion	1188	-	2,43
$\alpha$ -terpineol	1193	1195	1,01
nerol	1231	1234	0,95
Neril-acetat	1367	1371	20
$\alpha$ -kompanen	1376	1378	0,48
Italicen	1402	1405	1,80
<i>Cis</i> - $\alpha$ -bergamoten	1414	1417	0,00
<i>Trans</i> - $\beta$ -kariofilen	1419	1421	0,90
<i>Trans</i> - $\alpha$ -bergamoten	1436	1437	0,00
Italidion I	1443	1446	2,37
Neril-propanoat	1455	1458	3,02
$\gamma$ -selinen	1475	1477	1,15
$\gamma$ -kurkumen	1480	1480	0,00
<i>Ar</i> -kurkumen	1484	1487	8,14
$\beta$ -selinen	1486	1488	6,85
Italidion II	1490	1493	6,16
$\alpha$ -selinen	1494	1496	6,06
$\delta$ -kadien	1523	1525	0,00
Feniletil-tiglat	1540	1541	0,00
Nerolidol	1566	1567	0,00
Italidion III	1582	1583	13,79
Viridiflor	1594	1591	0,00
Gvaiol	1597	1599	0,00
Humulen epoksid II	1605	1605	0,00
Rosifoliol	1608	1611	0,77
$\gamma$ -eudesmol	1651	1634	0,00
$\tau$ -kadinol	1643	1644	0,00
$\beta$ -eudesmol	1651	1654	0,00
$\alpha$ -murol	1656	1654	2,15
$\beta$ -bisabolol	1671	1672	0,00
Neril-heksanoat	1729	1731	0,60



## 4. ZAKLJUČAK

Eterično ulje dobiveno vodenom destilacijom smilja pokazalo je citotoksični potencijal na dvije stanične linije: koža (fibroblast) i rak dojke. Kako su eterična ulja složene smjese, simulirano je eterično ulje smilja koristeći pet čistih spojeva: linalol,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, nerol i nerolidol. Rezultati su pokazali konačan antagonistički učinak na njihov pojedinačni citotoksični potencijal, očitiji u staničnoj liniji MDA-MB-231, za koju su pojedinačni spojevi bili toksičniji nego u HDF staničnoj liniji. Ovi rezultati objašnjavaju zašto je ova je stanična linija bila otpornija za eterično ulje smilja. naposljetku, ova studija podupire ideju o benefitima korištenja eteričnog ulja smilja u prehrani.

## 5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

GC-plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*)

GC-MS-plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *Gas chromatography-mass spectrometry*)

SAM- skenirajući elektronski mikroskop (engl. *Scanning electron microscope*)

MDA-MB-231- stanična linija karcinoma dojke (engl. *breast cancer*)

HDF-zdrava stanična linija dermalnog ljudskog fibroblastata (engl. *Human dermal fibroblast*)

MTT-(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) (engl. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

RI-indeks zadržavanja (engl. *Retention index*)

IC<sub>50</sub>-maksimalna inhibitoriska koncentracija (engl. *Half maximal inhibitory concentration*)

FAA-formalin acetoacid-etil alkohol (engl. *formalin-acetic acid alcohol*)

NAD(P)H-nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

DMEM Dulbekov modificirani Eaglov medij (engl. *Dulbecco`s Modified Eagle Medium*)

## 6. LITERATURA

1. M. Glumac, Z. Jažo, V. Paštar, A. Golemac, V. Čikeš Čulić, S. Bektić, M. Radan, I. Carev, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Essential oil phytochemical profile and its biological activity (2023)
2. T. Ninčević, M. Grdiša, Z. Šatović, M. Jug-Dujaković, *Helichrysum italicum* *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, Biological Activity, Biochemical and Genetic Diversity. *Ind Crops Prod* (2019), (138).
3. M. Zec Vojinović, S. Dudaš, M. Peršić, M. Magdić, ; M. Tomičić, Morphometric Characteristics of *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don. from Northwestern Coast of Istria. *Zbornik Veleučilišta u Rijeci* (2022), (10), 453–466, doi:10.31784/zvr.10.1.25.
4. D. Antunes Viegas, A. Palmeira-De-Oliveira, L. Salgueiro, J. Martinez-De-Oliveira, R. Palmeira-De-Oliveira, *Helichrysum italicum*: From Traditional Use to Scientific Data. *J Ethnopharmacol* (2014), 151, 54–65.
5. M. Galbany-Casals, J.M. Blanco-Moreno, N. Garcia-Jacas, I. Breitwieser, R.D. Smissen, Genetic Variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): Do Disjunct Populations of Subsp. *Microphyllum* Have a Common Origin? *Plant Biol* (2011), 13, 678–687, doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00411.x.
6. Z. Jažo, M. Glumac, I. Drventić, L. Žilić, T. Dujmović, D. Bajić, M. Vučemilo, E. Ivić, S. Bektić, G.T. Anačkov, et al. The Essential Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don., Influence of Steam, Hydro and Microwave-Assisted Distillation. *Separations* (2022), 9, doi:10.3390/separations9100280.
7. Slika 1. <https://www.bioeterica.hr/wp-content/uploads/2021/05/Smilje-tekuce-zlato-mediterana-2.jpg>
8. Slika 2. <https://www.fairylandhealth.com/wp-content/uploads/2020/11/smilje-final-1024x683.jpg>
9. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Split, (2009.) str.39
10. L. G. Wade, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, (2017)

11. <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/destilacija/>
12. *SH. Pine*, Organska kemija, Zagreb, Školska knjiga; (1994). 1130-32.
13. <https://en.wikipedia.org/wiki/Linalool>
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=LINALOL>
15. Slika 4. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Linalool\\_skeletal.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Linalool_skeletal.svg)
16. <https://en.wikipedia.org/wiki/Nerol>
17. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/643820>
18. Slika 5. [https://file.medchemexpress.com/product\\_pic/hy-n7063.gif](https://file.medchemexpress.com/product_pic/hy-n7063.gif)
19. *C. Weng-Keong, T. Loh Teng-Hern, C. Kok-Gan, L. Learn-Han and G. BeyHing*, Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faced Pharmacological and Biological Activities. Asia, (2016.)
20. *J. Hanušova*, The effect of Myrica rubra essential oil and its components  $\alpha$ -humulene and trans-nerolidol on adhesion and apoptosis of colorectal cancer cells, *Can. Cell Microenviron*, **2**, (2015.)
21. *Ryabchenko*, Cytotoxic properties of Selected Sesquiterpene Alcohols on Human Cervix Carcinoma Cell Lines, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, (2011.), **14(3)**, 316–319.
22. *Ryabchenko*, Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *X.*, *Cancer letters*, (2002.)
23. Slika 6. [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bb/Nerolidol\\_-\\_cis.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bb/Nerolidol_-_cis.png)
24. <https://en.wikipedia.org/wiki/Terpineol>
25. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=TERPINEOL>
26. [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d0/Terpineol\\_alpha.svg/800px-Terpineol\\_alpha.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d0/Terpineol_alpha.svg/800px-Terpineol_alpha.svg.png)

27. <https://en.wikipedia.org/wiki/Terpinen-4-teol>
28. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=Terpinen-4-ol>
29. Slika 7. [https://www.extrasynthese.com/57825-large\\_default/terpinen-4-ol.jpg](https://www.extrasynthese.com/57825-large_default/terpinen-4-ol.jpg)
30. *L. Bilandžija, B. Bilandžija, L. Pollak, S. Inić*, Kemijski sastav, biološka aktivnost i primjena smilja u medicini i farmaciji, (2020), **78**, 229-248
31. *Z. Jažo*, Citotoksična aktivnost eteričnog ulja kadulje ( *Salvia officinalis* l. ) i smilja ( *Helichrysum italicum* ( Roth ) G. Don. ), Diplomski rad ( 2019 ) Split .
32. Slika 9. *A. Radonić*, Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.) Magistarski rad KTF, Split,(2000)
33. *Nj. Radić , L. Kukoč-Modun*, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, (2011), 630.-650.
34. *L. Kukoč – Modun*, Instrumentne metode analize,(2022) dio predavanj,str.103.
35. *Skoog DA, H. West DM, FJ*. Uvod u kromatografske metode. In: Osnove analitičke kemije. Školska knjiga; (1999). p. 645-74.,GC MS
36. *J. Pranjić*, Primjena GC – MS u istraživanju raka, Završni rad, (2020), Split
37. *A. Perković*., Kvantitativno određivanje fenola iz uzorka krvi i mokraće primjenom GC-MS metode, Diplomski rad, ( 2018 ), Split
38. Slika 10.
- [https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.enciklopedija.hr%2FIlustracije%2FHE7\\_0286.jpg&tbnid=W3XIpkafGU\\_NAM&vet=12ahUKEwiA79ulqK2BAxVR9rsIHTW9C5cQMygAegQIARBM..i&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.enciklopedija.hr%2Fnatuknica.aspx%3FID%3D39268&docid=Da0a\\_iivOfMHDM&w=960&h=514&q=Maseni%20Spektrometar&ved=2ahUKEwiA79ulqK2BAxVR9rsIHTW9C5cQMygAegQIARBM](https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fwww.enciklopedija.hr%2FIlustracije%2FHE7_0286.jpg&tbnid=W3XIpkafGU_NAM&vet=12ahUKEwiA79ulqK2BAxVR9rsIHTW9C5cQMygAegQIARBM..i&imgrefurl=https%3A%2F%2Fwww.enciklopedija.hr%2Fnatuknica.aspx%3FID%3D39268&docid=Da0a_iivOfMHDM&w=960&h=514&q=Maseni%20Spektrometar&ved=2ahUKEwiA79ulqK2BAxVR9rsIHTW9C5cQMygAegQIARBM)
39. *E. de Hoffman, V.Stroombant*, Mass spectrometry- principles and applications, third edition, (2007), 217-230

40. Slika 11. [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.labmate-online.com%2Fnews%2Fchromatography%2F1%2Fthermo-fisher-scientific-chromatography-and-mass-spectrometry%2Fnext-generation-triple-quadrupole-gc-ms-designed-to-be-more-sensitive-and-three-times-faster-than-predecessor-the-gc-msmsnbsp-system-for-the-modern-environmental-laboratory%2F33514&psig=AOvVaw0dq2GT6m84vrLSGyn4Jezt&ust=1695172525783000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBAQjRxqFwoTCOirz\\_W\\_tYEDFQAAAAAdAAAAABAV](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.labmate-online.com%2Fnews%2Fchromatography%2F1%2Fthermo-fisher-scientific-chromatography-and-mass-spectrometry%2Fnext-generation-triple-quadrupole-gc-ms-designed-to-be-more-sensitive-and-three-times-faster-than-predecessor-the-gc-msmsnbsp-system-for-the-modern-environmental-laboratory%2F33514&psig=AOvVaw0dq2GT6m84vrLSGyn4Jezt&ust=1695172525783000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBAQjRxqFwoTCOirz_W_tYEDFQAAAAAdAAAAABAV)
41. *G.M. Cooper, R.E. Hausman, ., Stanica*, Medicinska naklada, Zagreb (2010), 725-726
42. *L. Beketić-Orešković, F. Šantek*, Karcinom dojke, Zagreb, (2018), Medicinska naklada
43. <https://www.atcc.org/products/htb-26#detailed-product-images>
44. <https://www.atcc.org/products/htb-26>
45. <https://www.atcc.org/products/pcs-201-012>
46. *I. Žilić*, Udžbenik za sakupljanje samoniklog bilja, Glina: Poljoprivredna zadruga Glinska Banovina, (2014) sakupljanje bilja
47. *M. Glumac, Z. Jažo, V. Paštar, A. Golemac, V. Čikeš Čulić, S. Bektić, M. Radan, I. Carev*, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Essential oil phytochemical profile and its biological activity (2023)
48. [https://en.wikipedia.org/wiki/MTT\\_assay](https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay)
49. *A. Šunjgera*, Antiproliferativno djelovanje nootkatona na dvije stanične linije raka, Završni rad (2019), Split.
50. *S.A. Mendanha, S.S. Moura, J.L.V Anjos, M.C. Valadares, A. Alnos*, Toxicity of Terpenes on Fibroblast Cells Compared to Their Hemolytic Potential and Increase in Erythrocyte Membrane Fluidity. *Toxicol. Vtr.* (2013), **27**, 323-329
51. *M. Glumac, V. Čikeš Čulić, I. Terzić-Marnović, M. Radan*, Mechanism of *Cis-Nerolidol* Induced Bladder Karcinom Cell Death, (2023), **15**, 981