



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
У НИШУ



Марина (В.) Димитријевић

**ЕФЕКАТ И СИНЕРГИСТИЧКО ДЕЈСТВО
ЕТАРСКИХ УЉА ОДАБРАНИХ
АРОМАТИЧНИХ И ЛЕКОВИТИХ БИЉНИХ
ВРСТА НА РАСТ И ФАКТОРЕ ВИРУЛЕНЦИЈЕ
ИЗОЛАТА РОДА *CANDIDA***

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским
и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе,
осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Ниш, 2025.



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
У НИШУ



Марина (В.) Димитријевић

**ЕФЕКАТ И СИНЕРГИСТИЧКО ДЕЈСТВО
ЕТАРСКИХ УЉА ОДАБРАНИХ
АРОМАТИЧНИХ И ЛЕКОВИТИХ БИЉНИХ
ВРСТА НА РАСТ И ФАКТОРЕ ВИРУЛЕНЦИЈЕ
ИЗОЛАТА РОДА *CANDIDA***

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2025.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Marina (V.) Dimitrijević

**EFFECT AND SYNERGISTIC ACTION OF
SELECTED AROMATIC AND MEDICINAL
PLANTS ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH
AND VIRULENCE FACTORS OF *CANDIDA*
ISOLATES**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2025.



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР :	
Идентификациони број, ИБР :	
Тип документације, ТД :	монографска
Тип записа, ТЗ :	текстуални / графички
Врста рада, ВР :	докторска дисертација
Аутор, АУ :	Марина В. Димитријевић
Ментор, МН :	Зорица Стојановић-Радић
Наслов рада, НР :	Ефекат и синергистичко дејство етарских уља одабраних ароматичних и лековитих биљних врста на раст и факторе вируленције изолата рода <i>Candida</i>
Језик публикације, ЈП :	српски
Језик извода, ЈИ :	енглески
Земља публикавања, ЗП :	Србија
Уже географско подручје, УГП :	Србија
Година, ГО :	2025.
Издавач, ИЗ :	ауторски репринт
Место и адреса, МА :	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО : (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	192 стране, 9 поглавља, 25 слика, 21 табела, 345 референци
Научна област, НО :	Биологија
Научна дисциплина, НД :	Микробиологија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО :	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , етарска уља, Lamiaceae, Asteraceae, Rutaceae, хемијски састав, синергизам, фактори вируленције
УДК	(633.81+547.913):(579.6+615.282.84) (633.88+547.913):(579.6+615.282.84)
Чува се, ЧУ :	библиотека
Важна напомена, ВН :	Експериментални део је урађен у Лабораторији за микробиологију, Департман за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу.

Извод, ИЗ :	У овој докторској дисертацији испитивана је антифунгална активност етарских уља биљних врста породица Lamiaceae (<i>Satureja montana</i>, <i>Thymus vulgaris</i>, <i>Origanum vulgare</i>), Asteraceae (<i>Inula helenium</i>, <i>Helichrysum italicum</i>) и Rutaceae (<i>Citrus aurantium</i>, <i>Citrus aurantifolia</i>, <i>Citrus limon</i>, <i>Citrus paradisi</i>), са циљем идентификације потенцијално нових агенаса за терапију кандидоза. Експерименти су спроведени на два сета хуманих клиничких изолата рода <i>Candida</i>: први сет чинили су изолати из различитих инфекција, а други вулвовагинални изолати. Испитиван је антифунгални и антивирулентни потенцијал уља, укључујући антибиофилм деловање, инхибицију формирања герминационих цеви и редукцију продукције фосфолипазе, као и њихову интеракцију са нистатином и међусобне интеракције појединачних уља. Извршена је анализа хемијског састава и одређене минималне инхибиторне концентрације (МИК), при чему је утврђена значајна анти-<i>Candida</i> активност: 0,312–2,500 mg/mL (Lamiaceae), 0,009–5,00 mg/mL (Asteraceae) и 0,009–10,00 mg/mL (Rutaceae). Уља су показала способност редукције биофилма при МИК и ½ МИК. Највећу активност према првом сету изолата показало је уље <i>I. helenium</i>, а према другом уље <i>C. aurantium</i>. Оба уља су значајно смањила формирање герминационих цеви и продукцију фосфолипазе, што указује на изразит антивирулентни потенцијал. Ови резултати доприносе бољем разумевању ефекта етарских уља против хуманих клиничких изолата <i>Candida</i> и њихове способности да редукују факторе вируленције, указујући на могућност њихове примене у суплементарној терапији кандидоза.
Датум прихватања теме, ДП :	06.06.2022.
Датум одбране, ДО :	
Чланови комисије, КО :	Председник: Члан: Члан: Члан:



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Marina V. Dimitrijević
Mentor, MN :	Zorica Stojanović-Radić
Title, TI :	Effect and synergistic action of selected aromatic and medicinal plants essential oils on the growth and virulence factors of <i>Candida</i> isolates
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2025.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/ap pendixes)	192 pages, 9 chapters, 25 figures, 21 tables, 345 references
Scientific field, SF :	Biology
Scientific discipline, SD :	Microbiology
Subject/Key words, S/KW :	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , essential oils, Lamiaceae, Asteraceae, Rutaceae, chemical composition, synergism, virulence factors
UC	(633.81+547.913):(579.6+615.282.84) (633.88+547.913):(579.6+615.282.84)
Holding data, HD :	library
Note, N :	The experimental part of this dissertation was done in the Laboratory of Microbiology, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš.

Abstract, AB :	In this doctoral dissertation, the antifungal activity of essential oils derived from plant species belonging to the families Lamiaceae (<i>Satureja montana</i>, <i>Thymus vulgaris</i>, <i>Origanum vulgare</i>), Asteraceae (<i>Inula helenium</i>, <i>Helichrysum italicum</i>), and Rutaceae (<i>Citrus aurantium</i>, <i>Citrus aurantifolia</i>, <i>Citrus limon</i>, <i>Citrus paradisi</i>) was investigated, with the aim of identifying potential new agents for the treatment of candidosis. Experiments were conducted on two sets of human clinical <i>Candida</i> isolates: the first set consisted of isolates from various infections, while the second set included vulvovaginal isolates. The study examined the antifungal and antivirulence potential of the oils, including antibiofilm activity, inhibition of germ tube formation, reduction of phospholipase production, as well as their interactions with nystatin and the mutual interactions between individual oils. Chemical composition analysis was performed, and minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined, revealing significant anti-<i>Candida</i> activity: 0.312–2.500 mg/mL (Lamiaceae), 0.009–5.00 mg/mL (Asteraceae), and 0.009–10.00 mg/mL (Rutaceae). The oils demonstrated the ability to reduce biofilm formation at MIC and ½ MIC. The highest activity against the first set of isolates was shown by <i>I. helenium</i> oil, while <i>C. aurantium</i> oil exhibited the greatest efficacy against the second set. Both oils significantly reduced germ tube formation and phospholipase production, indicating a pronounced antivirulence potential. These findings contribute to a better understanding of essential oils' effect against human clinical <i>Candida</i> isolates and their capacity to reduce virulence factors, highlighting the possibility of their application as adjunctive therapy for candidosis.
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	06.06.2022.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President:
	Member:
	Member:
	Mentor:

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Зорица Стојановић-Радић, редовни професор, Департман за биологију и екологију, Природно-математички факултет у Нишу, Универзитет у Нишу

Наслов:

Ефекат и синергистичко дејство етарских уља одабраних ароматичних и лековитих биљних врста на раст и факторе вируленције изолата рода *Candida*

Резиме:

У овој докторској дисертацији испитивана је антифунгална активност етарских уља биљних врста породица Lamiaceae (*Satureja montana*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*), Asteraceae (*Inula helenium*, *Helichrysum italicum*) и Rutaceae (*Citrus aurantium*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus limon*, *Citrus paradisi*), са циљем идентификације потенцијално нових агенаса за терапију кандидоза. Експерименти су спроведени на два сета хуманих клиничких изолата рода *Candida*: први сет чинили су изолати из различитих инфекција, а други вулвовагинални изолати.

Испитиван је антифунгални и антивирулентни потенцијал уља, укључујући антибиофилм деловање, инхибицију формирања герминационих цеви и редукцију продукције фосфолипазе, као и њихова интеракција са нистатином и међусобне интеракције појединачних уља.

Извршена је анализа хемијског састава и одређене минималне инхибиторне концентрације (МИК), при чему је утврђена значајна анти-*Candida* активност: 0,312–2,500 mg/mL (Lamiaceae), 0,009–5,00 mg/mL (Asteraceae) и 0,009–10,00 mg/mL (Rutaceae). Уља су показала способност редукције биофилма при МИК и ½ МИК. Највећу активност према првом сету изолата показало је уље *I. helenium*, а према другом уље *C. aurantium*. Оба уља су значајно смањила формирање герминационих цеви и продукцију фосфолипазе, што указује на изразит антивирулентни потенцијал. Ови резултати доприносе бољем разумевању потенцијала етарских уља против хуманих клиничких изолата *Candida* и њихове способности да редукују факторе вируленције, указујући на могућност њихове примене у суплементарној терапији кандидоза.

Научна област:

Биологија

Научна
дисциплина:

Микробиологија

Кључне речи:	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , етарска уља, Lamiaceae, Asteraceae, Rutaceae, хемијски састав, синергизам, фактори вируленције
УДК:	(633.81+547.913):(579.6+615.282.84) (633.88+547.913):(579.6+615.282.84)
CERIF класификација:	В 230 Микробиологија, бактериологија, вирусологија, микологија
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD, Zorica Stojanović-Radić, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš
Title:	Effect and synergistic action of selected aromatic and medicinal plants essential oils on the growth and virulence factors of <i>Candida</i> isolates
Abstract:	In this doctoral dissertation, the antifungal activity of essential oils derived from plant species belonging to the families Lamiaceae (<i>Satureja montana</i>, <i>Thymus vulgaris</i>, <i>Origanum vulgare</i>), Asteraceae (<i>Inula helenium</i>, <i>Helichrysum italicum</i>), and Rutaceae (<i>Citrus aurantium</i>, <i>Citrus aurantifolia</i>, <i>Citrus limon</i>, <i>Citrus paradisi</i>) was investigated, with the aim of identifying potential new agents for the treatment of candidosis. Experiments were conducted on two sets of human clinical <i>Candida</i> isolates: the first set consisted of isolates from various infections, while the second set included vulvovaginal isolates. The study examined the antifungal and antivirulence potential of the oils, including antibiofilm activity, inhibition of germ tube formation, reduction of phospholipase production, as well as their interactions with nystatin and the mutual interactions between individual oils. Chemical composition analysis was performed, and minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined, revealing significant anti-<i>Candida</i> activity: 0.312–2.500 mg/mL (Lamiaceae), 0.009–5.00 mg/mL (Asteraceae), and 0.009–10.00 mg/mL (Rutaceae). The oils demonstrated the ability to reduce biofilm formation at MIC and ½ MIC. The highest activity against the first set of isolates was shown by <i>I. helenium</i> oil, while <i>C. aurantium</i> oil exhibited the greatest efficacy against the second set. Both oils significantly reduced germ tube formation and phospholipase production, indicating a pronounced antivirulence potential. These findings contribute to a better understanding of the potential of essential oils against human clinical <i>Candida</i> isolates and their capacity to reduce virulence factors, highlighting the possibility of their application as adjunctive therapy for candidosis.
Scientific Field:	Biology
Scientific Discipline:	Microbiology

Key Words:

Candida albicans, *Candida krusei*, essential oils, Lamiaceae, Asteraceae, Rutaceae, chemical composition, synergism, virulence factors

UDC:

(633.81+547.913):(579.6+615.282.84)
(633.88+547.913):(579.6+615.282.84)

CERIF
Classification:

B 230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Захвалница

Најсрдачније се захваљујем свима који су допринели успешној реализацији ове докторске дисертације.

Највећу захвалност дугујем свом ментору, проф. др Зорици Стојановић-Радић, редовном професору на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Нишу, на несебичној подршци, разумевању, стрпљењу, пријатељском приступу и вредним саветима. Хвала Вам на свему...

Велику захвалност дугујем и проф. др Нику Радуловићу, редовном професору на Департману за хемију, Природно-математичког факултета у Нишу, на речима подршке, стручним саветима и драгоценој помоћи током мог научно-истраживачког пута, хвала Вам на сугестијама и коментарима који су допринели квалитету мог рада.

Захвална сам председнику комисије, проф. др Татјани Михајилов-Крстев, редовном професору на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Нишу, на издвојеном времену, подршци и конструктивним сугестијама који су унапредили ову дисертацију.

Хвала члану комисије, проф. др Олгици Стефановић, ванредном професору на Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу, на издвојеном времену, подршци и сугестијама.

Захваљујем се Милицы Нешић, асистенту на Департману за хемију, Природно-математичког факултета у Нишу, на сарадњи током експерименталног дела хемијске анализе етарских уља, на подршци, саветима, позитивној енергији, срдачности и пријатељству.

Бескрајну захвалност дугујем својим родитељима, на подрици и разумевању током периода студирања и израде дисертације, хвала на помоћи, ослоњу и ветру у леђа да истрајем у остварењу свог циља.

Хвала мојој сестри на стрпљењу, мотивацији, емотивној подрици и стручним саветима током свих ових година.

На посебан начин желим да се захвалим мом плишаном дечаку, на сваком осмеху, загрљају и несебичној љубави, мојој мотивацији и инспирацији за успешну реализацију овог истраживачког путовања.

М.

Ознаке и скраћенице

Номенклатура

n – нормалан низ

p – пара

E – Ентгетен (стереодескриптор)

Z – Зузаммен (стереодескриптор)

Мерне јединице

°C – Целзијусов степен

% - проценат

mm – милиметар

μm – микрометар

min – минут

h – сат

s – секунда

mL – милилитар

μl – микролитар

mg – милиграм

g – грам

g/L – грам по литру

CFU – енгл. Colony forming unit (колонијалне формирајуће јединице)

CFU/mL – енгл. Colony forming unit (колонијалне формирајуће јединице) по милилитру

eV – електрон Волт

m/z – однос масе и наелектрисања

rpm – енгл. Revolution per minute (број обртаја у минути)

Реагенси и растварачи

EtOH – етанол

NaCl – натријум хлорид

Et₂O – диетил-етар

ДМСО – диметилсулфоксид

PBS – енгл. Phosphate buffer saline (Фосфатни пуферски раствор)

КВ – кристал виолет

Подлоге

СДА – Сабуро декстрозни агар

СДБ – Сабуро декстрозни бујон

RPMI 1640 – енгл. Roswell Park Memorial Institute (обогата хранљива подлога за култивацију ћелија)

egg yolk agar – хранљива агарна подлога са додатком жуманцета

Кандида хромогени агар – селективна и диференцијална подлога за брзу изолацију и идентификацију *Candida*

Остало

MRSA – метицилин резистентни *Staphylococcus aureus*

spp. – енгл. species (врсте)

С – синергистички ефекат

А – адитивни ефекат

Ант. – антагонистички ефекат

МИК – минимална инхибиторна концентрација

ФИК – фракциона инхибиторна концентрација

ФИКИ – индекс фракционе инхибиторне концентрације

ОД – оптичка густина

СД – стандардна девијација

ГС – гасна хроматографија

MS – масена спектрометрија

GC/MS – гасна хроматографија са масеним детектором

GC/FID – гасна хроматографија са пламено-јонизационим детектором

суп. – енгл. synonym (синоним)

RI – ретенциони индекс у односу на *n*-алкане

MS – идентитет једињења утврђен поређењем њихових масених спектра

CoI – идентитет једињења додатно потврђен ко-инјекцијом аутентичног узорка

н.д. – није детектовано

тр. – трагови

Бр. – број

ЕО – етарско уље

NY – нистатин

T/O – Thymus vulgaris/Origanum vulgare

T/NY – Thymus vulgaris/Нистатин

O/NY – O. vulgare/Нистатин

S/O – Satureja montana/Origanum vulgare

S/T – S. montana/T. vulgaris

S/NY – S. montana/Нистатин

H/NY – H. italicum/Нистатин

I/NY – I. helenium/Нистатин

Ca/Cl – C. aurantium/C. aurantifolia

Cl/NY – C. aurantifolia/Нистатин

Ca/NY – C. aurantium/Нистатин

ANOVA – енгл. Analysis of variance (Анализа варијансе)

ATCC – енгл. American Type Culture Collection

Садржај:

1. УВОД	1
2. Циљеви истраживања	3
3. Општи део.....	4
3.1. Опште карактеристике рода <i>Candida</i> spp.....	4
3.1.1. Фактори вируленције рода <i>Candida</i> spp.	5
3.1.2. Особине кандидоза	8
3.1.3. Резистенција на антимикотике	9
3.2. Опште карактеристике етарских уља	10
3.2.1. Опште карактеристике етарских уља биљака из породице Lamiaceae	11
3.2.1.1. <i>Origanum vulgare</i> L.	11
3.2.1.2. <i>Thymus vulgaris</i> L.....	12
3.2.1.3. <i>Satureja montana</i> L.....	13
3.2.2. Опште карактеристике етарских уља биљака из породице Asteraceae	14
3.2.2.1. <i>Inula helenium</i> L.	14
3.2.2.2. <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don.....	16
3.2.3. Опште карактеристике етарских уља биљака из породице Rutaceae	17
3.2.3.1. <i>Citrus aurantium</i> L.	18
3.2.3.2. <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle.....	19
3.2.3.3. <i>Citrus limon</i> L.	20
3.2.3.4. <i>Citrus paradisi</i> L.....	21
3.3. Преглед литературе о хемијском саставу и анти- <i>Candida</i> активности етарских уља одабраних биљака породица Lamiaceae, Asteraceae и Rutaceae	22
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	43
4.1. Клинички изолати рода <i>Candida</i> spp.	43
4.1.1. Подлоге и реагенси.....	44
4.2. Биљни материјал	46
4.3. Поступак припреме узорака	46
4.3.1. Хидродестилација етарских уља <i>I. helenium</i> и <i>S. montana</i>	46

4.4. Методе	47
4.4.1. Хемијска анализа (гасна хроматографија са пламено-јонизационим детектором - GC/FID и гасна хроматографија са масеним детектором - GC/MS).....	47
4.4.2. Испитивање анти- <i>Candida</i> активности одабраних етарских уља	48
4.4.2.1. Микродилуциона метода.....	48
4.4.2.2. Праћење анти- <i>Candida</i> активности одабраних уља током времена	49
4.4.3. Испитивање типа интеракције тест супстанци	50
4.4.3.1. Метода шаховске табле	50
4.4.4. Испитивање утицаја на факторе вируленције <i>Candida</i>	50
4.4.4.1. Кристал виолет метода (КВ)	50
4.4.4.2. Испитивање продукције/редукције герминационих цеви <i>C. albicans</i>	51
4.4.4.3. Испитивање способности продукције/редукције фосфолипазе	51
4.4.5. Статистичка анализа.....	52
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	53
5.1. Хемијски састав, анти- <i>Candida</i> и антивирулентна активност етарских уља одабраних биљних врста породице Lamiaceae	54
5.1.1. Хемијски састав етарских уља биљних врста <i>O. vulgare</i> , <i>T. vulgaris</i> и <i>S. montana</i>	54
5.1.2. Испитивање анти- <i>Candida</i> активности одабраних етарских уља	58
5.1.3. Праћење анти- <i>Candida</i> активности етарских уља током времена	61
5.1.4. Тип интеракције уља комбинованих са нистатином/другим уљима	65
5.1.5. Антивирулентни ефекат	69
5.2. Хемијски састав, анти- <i>Candida</i> и антивирулентна активност етарских уља одабраних биљних врста породице Asteraceae.....	72
5.2.1. Хемијски састав етарских уља биљних врста <i>I. helenium</i> и <i>H. italicum</i>	72
5.2.2. Испитивање анти- <i>Candida</i> активности одабраних етарских уља	76
5.2.3. Праћење анти- <i>Candida</i> активности етарских уља током времена	80
5.2.4. Тип интеракције уља комбинованих са нистатином/другим уљима	82
5.2.5. Антивирулентни ефекат	85
5.2.5.1. Активност етарског уља врсте <i>I. helenium</i> L. на герминацију врсте <i>C. albicans</i> и продукцију ензима фосфолипазе.....	88

5.3. Хемијски састав, анти- <i>Candida</i> и антивирулентна активност етарских уља одабраних биљних врста породице Rutaceae	93
5.3.1. Хемијски састав етарских уља биљних врста <i>C. limon</i> , <i>C. aurantium</i> , <i>C. aurantifolia</i> , и <i>C. paradisi</i>	94
5.3.2. Испитивање анти- <i>Candida</i> активности одабраних етарских уља	98
5.3.3. Праћење анти- <i>Candida</i> активности етарских уља током времена	102
5.3.4. Тип интеракције уља комбинованих са нистатином/другим уљима	105
5.3.5. Антивирулентни ефекат	108
5.3.5.1. Активност етарског уља врсте <i>C. aurantium</i> L. на герминацију врсте <i>C. albicans</i> и продукцију ензима фосфолипазе	111
6. ЗАКЉУЧАК	117
7. SUMMARY	119
8. ЛИТЕРАТУРА	121
БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ	164

1. УВОД

Род *Candida* обухвата више од 200 врста, од којих је само неколико патогено за човека, а све припадају групи опортунистичких патогена. *Candida albicans* је најчешћи узрочник интрахоспиталних гљивичних инфекција, нарочито код особа са ослабљеним имуним системом. Инфекције које изазивају врсте рода *Candida* називају се кандидозе и могу бити површинске (захватају кожу, косу и нокте) или системске, када инфицирају виталне органе и могу се ширити кроз крвоток, изазивајући тешке клиничке форме болести (Hani et al., 2015; Talapko et al., 2021; Mayer et al., 2013).

Патогеност кандиди повезана је са продукцијом фактора вируленције као што су адхеренција, диморфизам и формирање герминационих цеви, способност формирања биофилма, као и продукција ензима хидролаза, фосфолипаза и протеиназа. Посебно је значајна способност изолата да формирају биофилм јер представља примарни механизам ширења инфекције и развоја рекурентности и хроничног тока болести. Биофилм чини организована заједница микроорганизама причвршћених за површину, обавијена екстрацелуларним полисахаридним матриксом, а његово присуство знатно повећава отпорност на антифунгалну терапију. Степен резистенције расте са сазревањем биофилма, што у комбинацији са повећањем броја хроничних и рекурентних инфекција захтева проналазак нових антифунгалних агенаса са другачијим механизмом дејства (Baj et al., 2020; Ghannoum, 2000; Oksuz et al., 2007; Samaranayake et al., 2005; Shirkhani et al., 2016; Talapko et al., 2021; Tsang et al., 2007).

Развој алтернативних терапијских приступа често подразумева смањење дозе постојећих антимикотика и њихово комбиновање са другим супстанцама ради постизања синергистичког ефекта, чиме се умањује токсичност и повећава ефикасност лечења. У том контексту, посебну пажњу привлаче секундарни метаболити биљака у облику етарских уља, која се добијају из различитих делова биљке и садрже сложене смеше испарљивих једињења специфичних за сваку врсту. Она могу садржати и више од стотину једињења, при чему је обично неколико присутно у највећим концентрацијама и носиоци су главне биолошке активности (Burt, 2004; Karpiński, 2020; Mounchid et al., 2005; Pedroso et al., 2019; Rusenova & Parvanov, 2009).

Предмет ове докторске дисертације био би испитивање хемијског састава, инхибиторног и синергистичког ефекта етарских уља одабраних биљних врста са циљем проналаска најактивнијих која би даље била анализирана као антифунгални агенси који ће значајно редуковати факторе вируленције клиничких изолата рода *Candida*. Наша претпоставка је да ће с обзиром на досадашње резултате о хемијском саставу, као и на показану антибактеријску и антифунгалну активност, сва уља умањити раст и/или продукцију фактора вируленције испитиваних изолата из рода *Candida*.

Конкретно би били детаљно анализирани хемијски профили етарских уља како би се идентификовали њихови главни састојци који су вероватно одговорни за горе поменућу значајну антифунгалну активност биљних метаболита. Пре свега, била би тестирана инхибиторна активност и одређене минималне инхибиторне концентрације етарских уља одабраних биљних врста породице Lamiaceae, Asteraceae и Rutaceae на два сета клиничких изолата *Candida*. Такође, била би праћена анти-*Candida* активност током времена (48 сати) како би се додатно потврдио антифунгални утицај испитиваних агенаса.

Како бисмо испитали потенцијал етарских уља да редукују активне дозе антимикотика који се користе у стандардној терапији кандидоза, наше истраживање би било фокусирано на испитивање типа интеракције тестираних (одабраних) етарских уља са референтним антимикотиком, нистатином. На овај начин испитали би потенцијални синергистички ефекат уља са антимикотиком, а поред овога, био би тестиран и тип интеракције међусобних комбинација одабраних етарских уља. Испитали бисмо утицај етарских уља одабраних биљних врста на смањење формирања биофилмова рода *Candida* применом минималне инхибиторне и суб-инхибиторне концентрације тестираног агенса. Даље би био испитиван утицај одабраних најактивнијих етарских уља (за оба сета изолата) на остале факторе вируленције кандида (герминационе цеви и ензиге фосфолипазе).

2. Циљеви истраживања

- Изолација етарских уља одабраних лековитих и ароматичних биљних врста
- Испитивање хемијског састава етарских уља ароматичних и лековитих биљака
- Карактеризација изолата рода *Candida* пореклом из хуманог материјала у односу на осетљивост/резистенцију на одабране антимикуробне агенсе и продукцију фактора вируленције
- Испитивање минималних инхибиторних концентрација у циљу утврђивања осетљивости различитих изолата кандида на етарска уља
- Праћење активности етарских уља на раст ћелија током времена (*time-kill curves*)
- Испитивање продукције формирања биофилма и тестирање антибиофилм активности одабраних етарских уља на изолате рода *Candida*
- Испитивање утицаја одабраних етарских уља на факторе вируленције тестираних хуманих изолата кандида
- Испитивање синергистичког потенцијала одабраних етарских уља, као и типа њихове интеракције са стандардним антимикуботиком (нистатин) на изолате рода *Candida*
- Селекција етарског уља са најбољим ефектом и предлог за његова даља проучавања у циљу оптимизације за употребу као суплементарне терапије у лечењу кандидоза

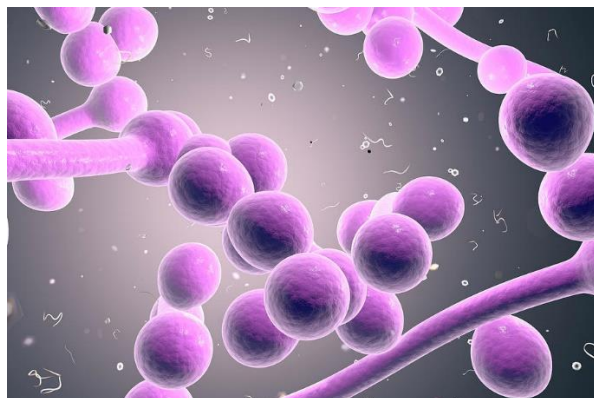
3. Општи део

3.1. Опште карактеристике рода *Candida* spp.

Род *Candida* обухвата више од 200 врста, од којих је само неколико хуманих патогена, а све припадају групи опортунистичких патогена. Ботаничарка Christine Marie Berkhout је истраживач која је прва описала врсту *Candida albicans* као и род *Candida* чији су ранији термини били „*Mycotorula*“ и „*Torulopsis*“. Будући да је саставни део нормалне микрофлоре човека, припадници овог рода се класификују као коменсални микроорганизми. Код здравих особа сматрају се делом микробиома и у тим случајевима не изазивају инфекције (Hani et al., 2015; Mayer et al., 2013; Talapko et al., 2021).

Candida albicans је најчешћи узрочник хуманих фунгалних инфекција и водећи узрочник интрахоспиталних инфекција, нарочито код пацијената са ослабљеним имуним системом, као што су оболели од АИДС-а, малигних болести или они који су подвргнути трансплантацији органа (Dadar et al., 2018; Falagas et al., 2010; Höfs et al., 2016; Martins et al., 2014; Sawant & Khan, 2017). Поред *C. albicans*, као чести узрочници инфекција издвајају се и врсте *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *C. guilliermondii*, *C. stellatoidea*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* и *C. auris*.

Candida albicans је представник врсте једноћелијских форми гљива и припада групи квасаца. Карактерише се појавом полиморфизма, што значи да може постојати у неколико морфолошких облика, укључујући квасолики облик, псеудохифе и праве хифе. Ћелије су округлог облика, величине од 3,0 до 7,5 μm . Природна је компонента микробиома гастроинтестиналног тракта, коже и женског гениталног система. Око 80,0% здраве популације подложно је развоју кандидозе. Инфекције чији је узрочник кандида могу варирати од благих до инвазивних системских инфекција, од којих неке представљају опасност по живот (Dadar et al., 2018; Hani et al., 2015; Jacobsen & Hube, 2017; Nobile & Johnson, 2015).



Слика 1. Микроскопски приказ врсте *C. albicans*¹

Иако је *C. albicans* најзначајнији узрочник настанка фунгалних инфекција (кандидоза), постоје и *non-albicans* врсте које су одговорне за значајан број инфекција. Један од представника ове групе, обухваћен нашим истраживањем, јесте *Candida krusei*. Описује се као диморфна гљива која се може изоловати са мукозних мембрана здравих особа. Њене ћелије су округле до издужене, када подсећају на зрна пиринча, а припада једноћелијским квасцима и размножава се пупљењем (Sachivkina et al., 2021; Samaranayake et al., 2005).

3.1.1. Фактори вируленције рода *Candida* spp.

Способност врста *Candida* да изазову инфекцију и оштећења директно су повезана са поседовањем фактора вируленције, укључујући њихову способност да формирају биофилмове, постоје у два различита облика (диморфизам), приањају на површине (адхеренција), производе екстрацелуларне ензиме и формирају герминационе цеви (Бај et al., 2020; Ghannoum, 2000; Oksuz et al., 2007; Samaranayake et al., 2005; Talapko et al., 2021; Tsang et al., 2007). Иницијални корак којим *Candida* spp. постају инвазивне јесте прелазак у хифални облик, при чему добијају могућност приањања и причвршћивања за дубље ткиво домаћина. Ове морфолошке промене ћелија кандиде, повезане су са постојањем протеина у ћелијском зиду који припадају адхезинима и инвазинима, и на тај начин долази до модулације имуног одговора хуманог организма (Lagunes & Rello, 2016).

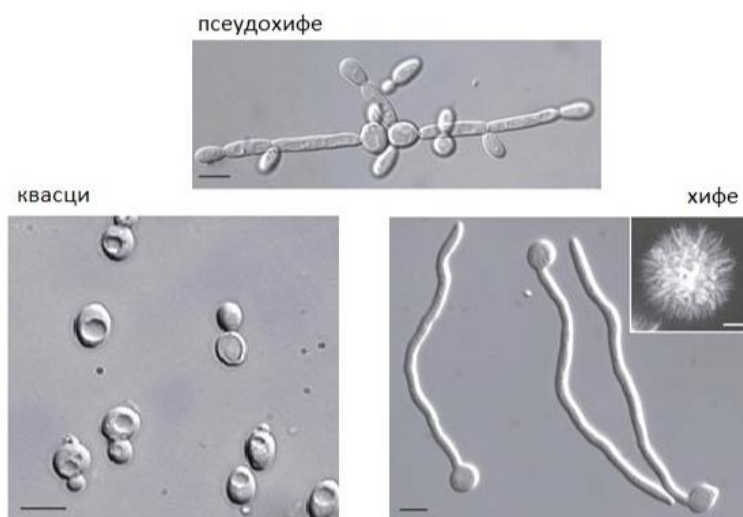
Биофилм је један од најзначајнијих вирулентних фактора, који има кључну улогу у ширењу инфекција и избегавању имуног одговора домаћина. Његово формирање значајно

¹ извор: <https://sciencephotogallery.com/featured/4-candida-albicans-fungi-kateryna-kon.html>

доприноси развоју мултирезистенције код квасаца рода *Candida*. Биофилмови су сложене структуре које се састоје од екстрацелуларног полимерног матрикса, изграђеног од макромолекула који делују као заштитна баријера против антимикуробних агенаса усмерених на ћелије *Candida*. Истраживачи Chandra et al. (2001) анализирали су развојне фазе формирања биофилма код *C. albicans* користећи два клинички релевантна биофилмска модела на биопротетичким материјалима. Они су установили да фазе обухватају трансформацију бластоспора и стварање дефинисаних ћелијских заједница окружених полисахаридним матриксом. Резултати су показали да биофилмови *C. albicans* имају високо хетерогену структуру, сачињену од ћелијских и нећелијских елемената. Ове структуре могу настајати како на биотским, тако и на абиотским површинама, што омогућава њихово лако формирање на различитим супстратима (Chandra et al., 2001). Медицински импланти, катетери и други болнички уређаји представљају значајан ризик, јер могу бити колонизовани ћелијским заједницама у форми биофилма. Биофилмови се често изолују са биотских површина, укључујући мукозне мембране органа, усне дупље и вагине. Њихово присуство може довести до формирања жаришта инфекције, доприносећи развоју хроничних болести које, у одређеним случајевима, могу прерасти у системске инфекције са високим степеном смртности (Nobile & Johnson, 2015; Rai et al., 2022; Sardi et al., 2013; Tsui et al., 2016). Прогресија отпорности на лекове директно је пропорционална процесу сазревања биофилмова (Sardi et al., 2013).

Посебна карактеристика квасца *C. albicans* је његова способност да се развија у различитим морфолошким облицима, који варирају од једноћелијских форми до правих хифа. Током морфолошког развоја, поред квасоликих форми, могу се формирати и псеудохифе. Способност преласка између квасаца, псеудохифалних и хифалних облика сматра се кључним фактором вируленције *Candida* врста (Mayer et al., 2013). Филаментација је карактеристика која може бити иницирана са више фактора средине, као што су: температура од 37 °C, алкална рН, присуство серума и високе концентрације CO₂. На исти начин, појачава се и недостатком азота и угљеника у присуству *N*-ацетилглюкозамина. Еукариотски организми (гљиве) имају јасно дефинисано једро са генетским материјалом (ДНК) које је окружено мембраном. Ћелијски зид је структура одговорна за механичку заштиту ћелије која може укључивати стресне факторе средине као и одбрану од имунолошких ћелија домаћина. Ћелијски зид доприноси адхезионој способности квасаца

за ћелије домаћина што им омогућава појачану вирулентну способност. Мембрана има веома важну улогу у преносу комуникационих сигнала између унутрашње и спољашње средине. Значајност састава мембране огледа се у присуству стерола који су важни приликом одбране ћелије, као и постојању фосфолипидног слоја који садржи протеине са могућношћу остваривања транспорта или преноса комуникационих сигнала. Ова морфолошка пластичност омогућава микроорганизму да продре у ткива и преноси се крвотоком, што значајно доприноси његовој патогености. У неповољним условима гајења, *C. albicans* може формирати хламидоспоре – округле ћелије са задебљалим зидовима, које служе као облик преживљавања у стресним околностима. Ови морфолошки прелази представљају адаптивни одговор квасца на промене у животној средини, омогућавајући му прилагођавање различитим биолошким нишама (Chaffin et al., 1998; Mayer et al., 2013; Stojanović et al., 2016; Talapko et al., 2021).



Слика 2. Морфолошки облици врсте *C. albicans*²

Термин „фосфолипазе“ односи се на хетерогену групу ензима способних за хидролизу једне или више естарских веза у глицерофосфолипидима. Иако су све фосфолипазе усмерене на фосфолипиде, сваки ензим има специфичну способност хидролизе одређених естарских веза. Због тога се квалификациона слова, као што су А, В, С и D, користе за диференцирање различитих типова фосфолипаза, указујући на

² извор: <https://microbeonline.com/germ-tube-test-candida-principle-procedure-results-interpretation/>

специфичност везе у циљаном фосфолипидном молекулу (Samaranayake et al., 2005). Инвазија ћелија домаћина подразумева њихову пенетрацију и оштећење, што је највероватније посредовано физичким или ензимским механизмима. Фосфолипиди и протеини чине основне хемијске компоненте ћелијске мембране, па се претпоставља да су ензими који хидролизују ове молекуле директно укључени у нарушавање интегритета мембране током инвазије. Хидролизом фосфолипидних молекула, фосфолипазе дестабилизују структуру мембране, чиме нарушавају њен интегритет, а самим тим и виталност ћелије (Ghannoum, 2000).

3.1.2. Особине кандидоза

Међу факторе ризика за настанак инфекција изазваних врстама из рода *Candida* spp. убраја се дуготрајна и неконтролисана употреба антибиотика, која доводи до смањења бројности нормалне микрофлоре. Овај дисбаланс ствара повољне услове за развој различитих типова гљивичних инфекција, укључујући кандидозе.

Кандидозе могу захватити различите делове тела и унутрашње органе, те се према локализацији могу поделити на оралне, вагиналне и цервикалне инфекције, као и цревне облике. Најтежи и најопаснији облик инфекције настаје када патоген продре у крвоток, изазивајући системску кандидозу, која може представљати озбиљну претњу по живот пацијента (Höfs et al., 2016; Pappas et al., 2016; Rodríguez-Cerdeira et al., 2019).

Вулвовагинитис, запаљење слузокоже вагине, честа је појава током репродуктивног периода жене, при чему чак 75% жена доживи ову инфекцију барем једном у животу. Фактори који доприносе лакшој и бржој колонизацији слузокоже укључују употребу оралних контрацептива, присуство инсулинске резистенције, као и физиолошке промене у трудноћи. Посебна карактеристика вагиналних и цервикалних кандидозних инфекција јесте њихова тенденција да се након одређеног времена поново јаве услед повољних услова, као што је дисбаланс микробиома, што резултира рекурентним инфекцијама (Marchaim et al., 2012; Neves et al., 2005; Rodríguez-Cerdeira et al., 2019).

3.1.3. Резистенција на антимикотике

Стандардно медицинско лечење кандидоза заснива се на употреби комерцијално доступних антимикотика, а избор зависи од изоловане и идентификоване врсте *Candida* као узročника инфекције, од имунолошког стања пацијента, локализације и познате сензитивности сојева на антифунгалне агенсе. Током година развијен је низ антифунгалних синтетских супстанци које се могу користити као терапија гљивичних инфекција код људи. Ефикасност лекова је утврђена низом истраживања *in vitro* и *in vivo* на тему њихове инхибиторне и фунгицидне активности. Три основне класе једињења која су у честој употреби као са утврђеним терапијским ефектом, јесу полиени, триазоли и ехинокандини. Амфотерицин Б (који припада полиенолској групи) и флуконазол (као најчешћи избор из групе триазола) употребљавају се за третмане различитих врсти локалних или системских микоза (Dadar et al., 2018; Pappas et al., 2016; Hani et al., 2015).

Злоупотреба и прекомерна употреба антимикотика довеле су до пораста (вишеструке) резистенције опортунистичких врста *Candida*, као и до појаве озбиљних нежељених ефеката. Стога је неопходно развити алтернативне стратегије за сузбијање и лечење гљивичних инфекција. Биљни екстракти и етарска уља познати су по својим природним антифунгалним и антибактеријским својствима. Ови природни производи прошли су опсежан глобални скрининг као потенцијални извори нових антимикробних једињења, нудећи алтернативне опције за терапију заразних болести (Baj et al., 2020; Gucwa et al., 2018; Karpiński, 2020; Pejčić et al., 2020; Soulaïmani et al., 2019; Stojanović-Radić et al., 2016).

Последњих година интензивирана су истраживања природних супстанци као потенцијалних антифунгалних агенаса, услед све веће резистенције изолата рода *Candida* на конвенционалне антимикотике и учесталих рекурентних инфекција. Будући да лечење кандидозе често захтева продужену терапију, алтернативни третмани могу значајно допринети ефикаснијем исходу лечења (Blanc et al., 2023; Cid-Chevecich et al., 2022; Karpiński et al., 2023). Природни агенси могу да испоље терапеутске ефекте са смањеним проблемима резистенције у поређењу са конвенционалним антимикробним лековима, што их чини интересантним за детаљнија испитивања њиховог антимикробног потенцијала (Cid-Chevecich et al., 2022; Almeida et al., 2016; Karpiński et al., 2023).

Ова студија има за циљ истраживање антифунгалних својстава етарских уља на различите сојеве рода *Candida* одговорних за настанак учесталих инфекција хумане популације. Надовезујући се на резултате претходних истраживања, која су показала синергистичке интеракције између различитих етарских уља и конвенционалних антимикотика у борби против референтних сојева и клиничких изолата рода *Candida*, наше истраживање настоји да додатно испита потенцијал етарских уља као обећавајуће алтернативе у сузбијању овог растућег проблема (Ermenlieva et al., 2022; Potente et al., 2020; Rosato et al., 2021; Soulaïmani et al., 2019; Soulaïmani et al., 2021).

3.2. Опште карактеристике етарских уља

Етарска уља су секундарни метаболити биљака, а њихова продукција зависи од врсте биљке и дела у коме се синтетишу. Описују се као ароматичне, уљане течности које представљају комплексне смеше стотина једињења, укључујући алкоhole, естре, угљоводонике, киселине, алдехиде и друга ароматична једињења (Chintaluri et al., 2015; Okunowo et al., 2013; Palazzolo et al., 2013).

Ова испарљива једињења синтетишу се у различитим деловима биљке и могу деловати као фитопротективни агенси. Њихова лековита својства заснивају се на специфичним фармаколошким особинама сваке биљне врсте. У фармацеутској индустрији користе се као компоненте лекова или активни састојци у шампонима, парфемима и другим козметичким препаратима. Поред тога, етарска уља имају широку примену у прехранбеној индустрији, где служе као природни конзерванси или побољшавају органолептичка својства намирница (Brul & Coote, 1999; Mounchid et al., 2005; Rusenova & Parvanov, 2009).

Етарска уља представљају сложена природна једињења која могу садржати од неколико до више стотина једињења процентуално заступљених у различитим количинама. Најзаступљенија два или три састојка означавају се као главни јер могу чинити и до 85% укупног састава уља, док су остале присутне у мањим количинама или у траговима (Burt, 2004). Као липофилна једињења, растворљива су у неполарним органским растварачима, попут етра, хексана и ксилена. Главни састојци етарских уља укључују угљоводонике, алкоhole, алдехиде, киселине, естре, кетоне, феноле и лактоне. Терпени су посебно значајни, јер граде функционално и структурално различите класе једињења. Они су

сачињени од изопренских јединица (C5), а најчешће се јављају монотерпени (C10) и сесквитерпени (C15), док су ређе заступљени хемитерпени (C5), дитерпени (C20), тритерпени (C30) и тетратерпени (C40). Терпеноиди су деривати терпенских једињења који садрже кисеоник, а молекули који су најчешће присутни у етарским уљима јесу управо монотерпени, настали упаривањем две изопренске јединице (C10). Сесквитерпени су им структурно и функционално слични (Bakkali et al., 2008).

Фенолна једињења садржана у етарским уљима биљака најчешће су одговорна за њихово антимикуробно дејство (Cosentino et al., 1999). Иако различита етарска уља могу имати сличан структурни састав, начин њиховог деловања на микроорганизме варира. Она могу утицати на ДНК и РНК молекуле, инхибирати синтезу токсина или изазвати коагулацију ћелијског садржаја. Поред тога, нека уља доводе до трајног оштећења мембране бактеријске ћелије, поремећаја транслокације протеина и електронског транспорта, што резултира инхибицијом раста или смрћу микроорганизма (Di Pasqua et al., 2007; Hammer et al., 2008; Hou & Huang, 2024).

3.2.1. Опште карактеристике етарских уља биљака из породице Lamiaceae

Етарска уља која потичу из породице Lamiaceae имају посебан значај како у фармакологији тако и у традиционалној медицини због високог садржаја терпена (нпр. камфор, карвакрол, 1,8-синеол, цитрал, *p*-цимен, гераниол, линалоол, тујон, тимол..) који им омогућавају снажна антифунгална својства (Baj et al., 2020; Karpiński, 2020; Vikrant et al., 2015).

3.2.1.1. *Origanum vulgare* L.

Origanum vulgare L. је вишегодишња, самоникла жбунаста биљка која припада породици Lamiaceae, и расте на стрмим падинама медитеранског слива, у јужној и западној Азији, као и у Индији (Shafiee-Hajabadi et al., 2014). Лековити део биљке представља надземни део (*Origanum herba*), богат танинима, фенолима (наригенин, апигенин и лутеолин), етарским уљем (које садржи тимол и карвакрол), монотерпенима (α - и β -пинени, линалоол), као и розмаринском, пирокатехинском и кафеинском киселином (Cleff et al., 2010; Khosravi et al., 2018; Oskay et al., 2015; Sarikurkcu et al., 2015).



Слика 3. Изглед биљне врсте *Origanum vulgare*³ а) изглед стабљике; б) изглед цвета.

Origanum vulgare садржи флавоноиде који имају снажно антиоксидативно дејство као и фенолна једињења која показују изразите антиинфективне и антиинфламаторне ефекте. Због тога се етарско уље оригана, добијено из надземног дела ове биљке, широко користе у фитотерапији, посебно у лечењу инфекција изазваних бактеријама и гљивама (Khosravi et al., 2018; Oskay et al., 2015; Sarikurkcu et al., 2015). Карвакрол представља доминантни састојак који је идентификован код већине испитиваних узорака (Baj et al., 2020; Proškovcová et al., 2021; Teixeira et al., 2013).

3.2.1.2. *Thymus vulgaris* L.

Thymus vulgaris (тимијан) је лековита, полужбунаста биљка са ароматичним, сивозеленим листовима и љубичастим или ружичастим цветовима, пореком из Средоземља где и данас расте у природним стаништима. Биљка има карактеристичан мирис тамјана, због чега је у народу позната као „тимијан“. Има дугу традицију употребе у медицинске сврхе, а његова херба садржи 0,8–1,5% етарског уља. Етарско уље тимијана је познато по својим експекторантним, диуретичким, антитусивним, антиспазмодичним и

³ извор: Драгана Јеначковић Гоцић

карминативним својствима (Borugă et al., 2014; El-Sayed & El-Sayed, 2021; Galovičová et al., 2021; Pandur et al., 2022).



Слика 4. Изглед биљне врсте *Thymus vulgaris* а) изглед стабљике⁴; б) изглед цвета⁵

Thymus vulgaris се одликује израженим хемијским полиморфизмом у погледу доминантног испарљивог једињења. До сада је идентификовано шест хемотипова његовог етарског уља, а то су: гераниол, линалоол, α -терпинеол, тујанол-4, тимол и карвакрол (Galovičová et al., 2021). У литератури је најчешће изолован тимол хемотип, при чему су тимол, γ -терпинен и p -цимен били главни састојци састава уља (Ahmad et al., 2014; Borugă et al., 2014; Wesołowska & Jadczak, 2019).

3.2.1.3. *Satureja montana* L.

Satureja montana је вишегодишња, жбунаста биљка која расте на кречњачким подлогама, каменитим и сунчаним стаништима. Распрострањена је у деловима јужне Европе, Медитеранског појаса, Алпских предела, северне Африке, на подручју од Кавказа до Иранских висоравни, а чест је становник и планинских предела наше земље. На Балканском полуострву ова врста обухвата три подврсте, и то: подврста *variegata* (Host) P. W. Ball, подврста *montana* L. и подврста *pisidica* (Wettst.) (Mihajilov-Krstev et al., 2014).

⁴ извор: <https://www.istockphoto.com/search/2/image-film?phrase=thymus+vulgaris>

⁵ извор: https://as2.ftcdn.net/v2/jpg/01/10/10/39/1000_F_110103911_QqBhXvZMt0QseLXr23TbDm1BAKJomwQ2.jpg

Лековити део биљке чине горњи делови стабљике са листовима и цветовима (*Satureja herba*), који се беру све до одрвенелог дела. У хемијском саставу уља *S. montana* доминирају једињења карвакрол, γ -терпинен и тимол (Kundaković et al., 2014; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Valizadeh et al., 2014).



Слика 5. Изглед биљне врсте *Satureja montana*⁶ а) изглед стабљике; б) изглед цвета.

Етарско уље врсте *S. montana* карактерише значајна биолошка активност, која обухвата антиинфламаторни и антиоксидативни (Kremer et al., 2015), имуномодулаторни и антиканцерогени (Kundaković et al., 2014), као и антимикробни ефекат (Aćimović et al., 2022; Ermenlieva et al., 2022; Kundaković et al., 2014; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Santos et al., 2019).

3.2.2. Опште карактеристике етарских уља биљака из породице Asteraceae

3.2.2.1. *Inula helenium* L.

Inula helenium (оман) је вишегодишња биљна врста која је распрострањена у Европи и Источној Азији, расте на влажним ливадама и засењеним подручјима. Род *Inula* обухвата

⁶ извор: Бранко Јотић

преко 100 врста, неке од њих имају посебан значај у традиционалној медицини, а њихови изолати представљају секундарне метаболите који имају важну биолошку активност (Seca et al., 2014). Врсте које имају посебан медицински значај су: *Inula helenium* L., *Inula racemosa*, *Inula viscosa* L. и *Inula britannica* L. (Spiridon et al., 2013). Корен омана се традиционално користи за лечење различитих болести као што су бронхитис, дијареја, ентерореја, паразитизам, болести плућа, као и туберкулоза (Huo et al., 2008; Konishi et al., 2002).



Слика 6. Изглед биљне врсте *Inula helenium*⁷ а) изглед стабљике; б) изглед цвета.

Inula helenium L. у Европи представља званични део фармакопеје у својству диуретика, дијафоретика, експекторанса, као и антихелминтика (Stojakowska et al., 2004). У источној Европи биљка се углавном користи за лечење респираторних инфекција, уринарних инфекција, поремећаја дигестивног система, као и промена на кожи (Stojanović-Radić et al., 2012). Оман је идентификован и као део флоре Копаоника и представља медицински значајну врсту која се примењује као антитусик у терапији кашља, бронхитиса, туберкулозе а такође се користи и у лечењу плеуритиса и астме (Jarić et al., 2007).

⁷ извор: Бранко Јотић

Сесквитерпенски лактони, алантолактон и изоалантолактон, су претходно истраживани и поседују низ биоактивних ефеката, укључујући антипролиферативни, антитуморски, антиинфламаторни, антиоксидативни, као и детоксификујући ефекат (Kim et al., 2007; Konishi et al., 2002; Lawrence et al., 2001; Petkova et al., 2015; Spiridonov et al., 2005; Stojanović-Radić et al., 2012).

3.2.2.2. *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don

Род *Helichrysum* обухвата преко хиљаду таксона, познатих по својој способности да производе различите секундарне метаболите, укључујући флавоноиде, тритерпеноиде и сесквитерпене. Ова једињења су, вероватно, одговорна за изузетну ефикасност етарских уља која су добијена из биљака овог рода. Име *Helichrysum* је изведено од грчких речи „*helios*“ (сунце) и „*chrysos*“ (злато), што одражава светло жуте цветове карактеристичне за ове биљке (Rosa et al., 2007; Sala et al., 2003).



Слика 7. Изглед биљне врсте *Helichrysum italicum*⁸ а) изглед стабљике; б) изглед цвета

⁸ извор: Бранко Јотић

Највише проучавана врста у оквиру овог рода је *Helichrysum italicum*, медитерански ароматични жбун познат по карактеристичним жутим цветовима. Припада реду *Asterales* и породици *Asteraceae*. Обично се налази дуж источне обале и на острвима Јадранског мора. *Helichrysum italicum* (смиље) је биљна врста позната по својим антиинфламаторним, антиалергијским и антимикуробним својствима. У традиционалној медицини се обично користи као диуретик, холеретик и експекторанс (Chinou et al., 1996).

Етнофармаколошке студије у различитим регионима Европе показале су да се етарско уље смила традиционално користи за лечење бројних болести, укључујући и оне које захтевају антимикуробне, антиоксидативне, антивирусне и антипролиферативне ефекте (Aćimović et al., 2021; Genčić et al., 2021; Mollova et al., 2020; Ninčević et al., 2019; Rosa et al., 2007; Sala et al., 2003; Šovljanski et al., 2024; Viegas et al., 2014).

3.2.3. Опште карактеристике етарских уља биљака из породице *Rutaceae*

Породица *Rutaceae* је широко распрострањена и узгаја се у различитим климатским подручјима, што доприноси њеном све већем економском значају. Обухвата више од 300 врста распоређених у шест родова, од којих је најзначајнији род *Citrus* (Giovanelli et al., 2020; Ugbabe Grace et al., 2019). Најчешће коришћене врсте из овог рода су *Citrus limon* (лимон), *Citrus aurantium* (горка поморанца), *Citrus aurantifolia* (лимета), *Citrus paradisi* (грејпфрут) и *Citrus reticulata* (мандарина).

Припадници рода *Citrus* налазе широку примену у различитим индустријским гранама, што их сврстава међу значајне природне изворе биолошки активних једињења. Секундарни метаболити цитруса, попут екстраката и етарских уља, садрже различите биолошки активне састојке чије се концентрације могу разликовати. Позната су њихова антимикуробна својства, антиоксидативно дејство, као и потенцијални антиинфламаторни и антиканцерогени ефекат (Espina et al., 2011; Jing et al., 2014; Klimek-Szczykutowicz et al., 2020; Narang & Jiraungkoorskul, 2016; Saeb et al., 2016; Singh et al., 2010).

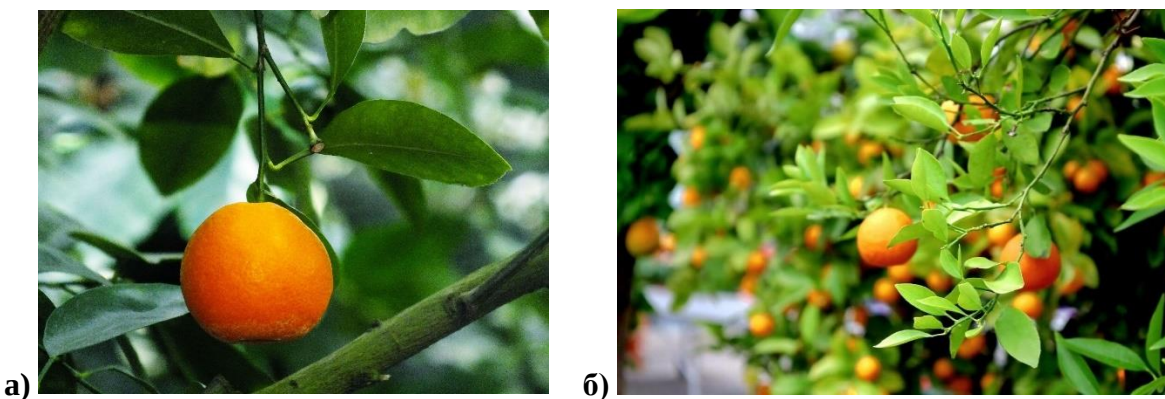
Подаци из литературе указују на значајне варијације у хемијском саставу етарских уља добијених из различитих врста цитруса. Ове разлике могу бити последица различитих метода изолације, генетског порекла, географских и климатских услова, као и фазе зрења плодова (Dosoky & Setzer, 2018; Fisher & Phillips, 2008). Лимонен представља доминантни

састојак хемијског састава већине етарских уља биљних врсти припадника породице Rutaceae (Al-Aamri et al., 2018; Mohammed et al., 2024). Lin et al. (2024) су у свом ревијалном раду представили низ биолошких активности лимонена, истичући његов антимикробни, антихелминтски, инсектицидни и медицински потенцијал (Lin et al., 2024).

3.2.3.1. *Citrus aurantium* L.

Citrus aurantium (горка поморанца) припада породици Rutaceae, а њено порекло се везује за Азију, нарочито Кину. Данас је распрострањена широм света у подручјима са одговарајућим климатским условима, најбоље успева у медитеранским земљама, као и у јужној и централној Америци (Boussaada & Chemli, 2006; Hojjati et al., 2016; Karthikeyan & Karthikeyan, 2014).

Citrus aurantium – листови, плодови, кора, цветови и корен – традиционално се користе у алтернативној медицини за лечење разних инфекција код људи. Најзначајнији производ горке поморанце је етарско уље, које се добија екстракцијом и налази широку примену у прехранбеној, парфимеријској и козметичкој индустрији, као и у ароматерапији. Поред тога, ово уље показује изражена антимикробна својства, укључујући антифунгално, антибактеријско и антиоксидативно дејство (Ouedrhiri et al., 2015; Sevindik et al., 2021; Suntar et al., 2018).



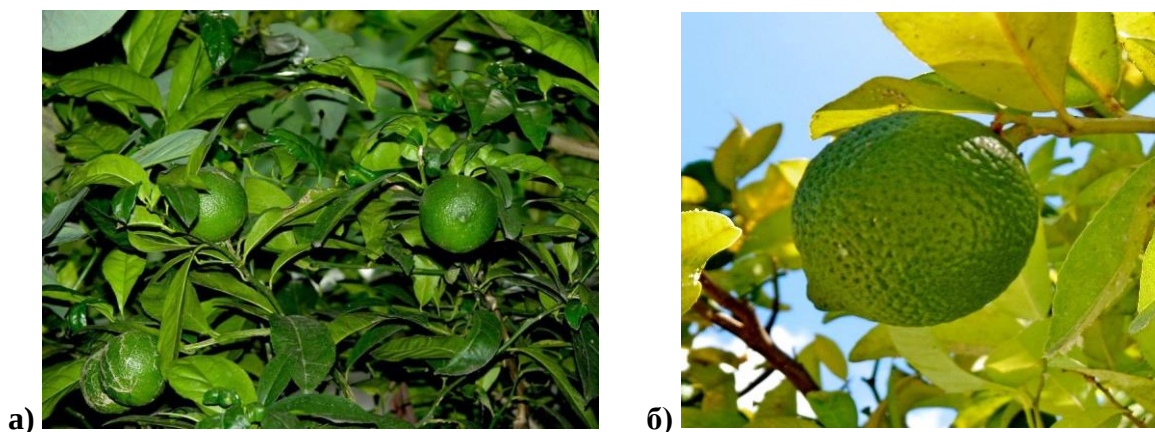
Слика 8. Изглед биљне врсте *Citrus aurantium*⁹ а) изглед плода; б) изглед стабљике.

⁹ извор: <https://identify.plantnet.org/sr/k-world-flora/species/Citrus%20C3%97%20aurantium%20L./data#galleries-fruit>

Индикације за њену употребу обухватају гастроинтестиналне тегобе, респираторна обољења, абдоминални бол, повишену температуру, инфекције уринарног тракта, а користи се и као седатив (Karthikeyan & Karthikeyan, 2014). Хемијски састав етарског уља *C. aurantium* представља основу за постојање терапеутског ефекта смањења симптома инфекција и инхибиције раста испитиваних микроорганизама (Ouedrhiri et al., 2015; Suntar et al., 2018). Главни састојци етарског уља горке поморанце су фенолна једињења, флавоноиди, витамини, минерали и терпеноиди (Suntar et al., 2018).

3.2.3.2. *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle

Citrus aurantifolia (лимета) је биљна врста која представља део породице Rutaceae. Пореклом из југоисточне Азије, ово вишегодишње, зимзелено дрво данас се узгаја широм света. Њени делови се од давнина користе у традиционалној медицини за лечење различитих инфекција, укључујући инфекције ока, респираторних органа, као и за ублажавање главобоље. Поред тога, лимета је веома цењена у кулинарству због свог освежавајућег укуса и богатих нутритивних вредности (Galovičová et al., 2022; Lin et al., 2019).



Слика 9. Изглед биљне врсте *Citrus aurantifolia*¹⁰ а) изглед стабљике; б) изглед плода.

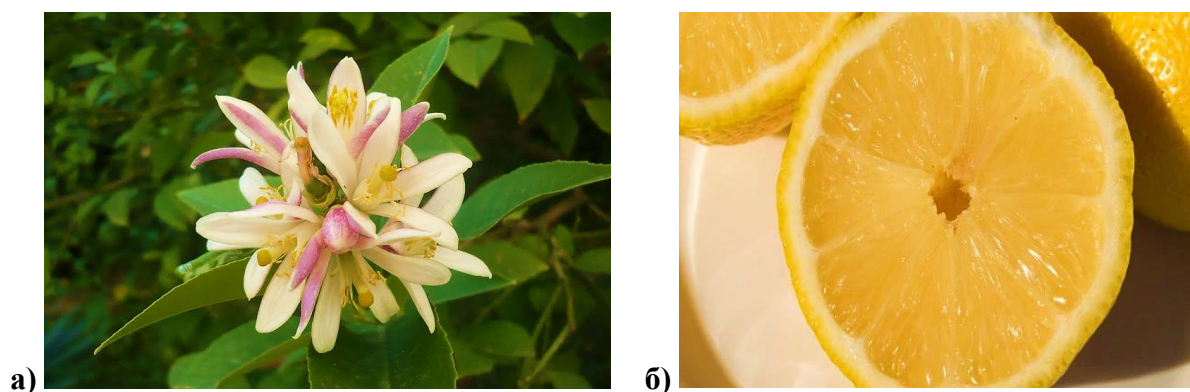
Етарско уље *C. aurantifolia* је познато по снажном антимикробном и антиоксидативном дејству па због тога налази широку примену у фармацеутској и козметичкој индустрији, као и у ароматерапији. Његова значајна биолошка активност

¹⁰ извор: [https://identify.plantnet.org/sr/k-world-flora/species/Citrus%20C3%97%20aurantifolia%20\(Christm.\)%20Swingle/data#galleries-habit](https://identify.plantnet.org/sr/k-world-flora/species/Citrus%20C3%97%20aurantifolia%20(Christm.)%20Swingle/data#galleries-habit)

приписује се сложенем хемијском саставу, у којем доминирају алдехиди, кетони, алкохоли, терпени, естри, феноли и етри (Al-Aamri et al., 2018; Cruz-Valenzuela et al., 2016; Lin et al., 2019).

3.2.3.3. *Citrus limon* L.

Citrus limon (лимон) је лековита биљна врста која припада породици Rutaceae. Представља зимзелено, вишегодишње дрво које достиже висину од 2,5 до 3,0 метра, најбоље успева на сунчаним стаништима, а порекло му се везује за северозападне или североисточне делове Индије. Његова лековита својства препозната су још у давних времена, када се лимунов сок традиционално користио за лечење скорбута. Осим тога, лимун је налазио примену и у ублажавању симптома прехладе, грознице, болова у грудима, реуматизма и нередовне менструације (Dhanavade et al., 2011; Klimek-Szczykutowicz et al., 2020; Saeb et al., 2016).



Слика 10. Изглед биљне врсте *Citrus limon*¹¹ а) изглед цвета; б) изглед плода.

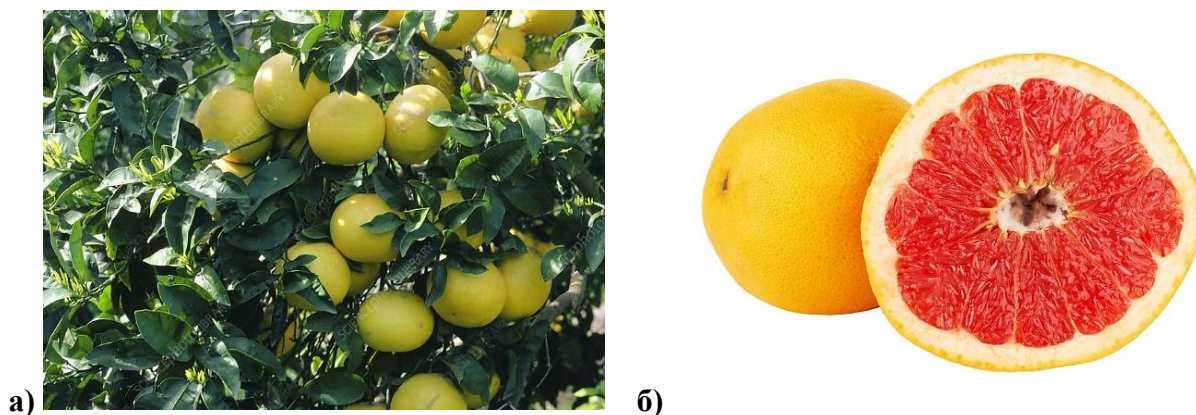
Citrus limon - из различитих делова ове биљке могу се изоловати етарска уља за која бројна истраживања указују на његов значајан антимикуробни потенцијал. Етарско уље лимуна поседује значајне ефекте, и то: антифунгална и антибактеријска активност (Dhanavade et al., 2011; Kačániová et al., 2024; Petretto et al., 2023), антиканцерогена и антиинфламаторна активност (Dosoky & Setzer, 2018), као и важан допринос козметичкој индустрији (Dosoky & Setzer, 2018). Биолошку активност етарског уља углавном одређују

¹¹ извор: <https://www.plantea.com.hr/limun/>

главна биоактивна једињења присутна у плоду и соку *C. limon*, међу којима се посебно истичу флавоноиди (Klimek-Szczykutowicz et al., 2020).

3.2.3.4. *Citrus paradisi* L.

Још један значајан представник породице Rutaceae, који има важно место у традиционалној медицини и прехранбеној индустрији, јесте грејпфрут (*C. paradisi*). Пореклом је из суптропских региона, али се данас контролисано узгаја широм света. Етарска уља и други секундарни производи грејпфрута већ вековима налазе примену у народној медицини, козметици и исхрани (Deng et al., 2022; Okunowo et al., 2013).



Слика 11. Изглед биљне врсте *Citrus paradisi*¹² а) изглед стабљике; б) изглед плода.

Citrus paradisi - као и остале описане врсте из рода *Citrus*, грејпфрут је у литератури препознат као ефикасан антимикуробни и антивирусни агенс, као и средство са израженим антиинфламаторним и антиоксидативним својствима. Поред тога, користи се као природни конзерванс и адстрингент (Kaouthar et al., 2020). Према доступним подацима хемијских анализа, састав етарског уља грејпфрута може варирати, али међу најзаступљенијим једињењима су: лимонен, β -мирцен, α -пинен, β -пинен и γ -терпинен, као и бројне друге састојке различитих хемијских група (Deng et al., 2022; Imran et al., 2013; Okunowo et al., 2013).

¹² извор: <https://www.sciencephoto.com/media/42567/view/citrus-paradisi->; <https://naturmedscientific.com/sr>

3.3. Преглед литературе о хемијском саставу и анти-*Candida* активности етарских уља одабраних биљака породица *Lamiaceae*, *Asteraceae* и *Rutaceae*

Од давнина је познато да различите врсте биљака могу имати велики спектар биолошких ефеката и представљају извор великог броја активних састојака. Етарска уља, као секундарни метаболити, поседују лековита својства и фармаколошки важна једињења која могу имати значајан ефекат по здравље људи. Активност природних производа умногоме зависи од хемијског састава, па је стога је веома важно експериментално утврдити једињења која чине њихове хемијске профиле. Главни састојци су носиоци потенцијалног антимикробног/антифунгалног ефекта етарских уља, али битно је истаћи да и мање заступљена једињења могу имати снажан утицај на активност.

У овој докторској дисертацији је испитиван састав етарских уља добијених из различитих делова одабраних биљака, па је зато у табелама 1, 2 и 3 дат преглед доступних публикованих научних резултата досадашњих испитивања хемијског састава одабраних уља три породице: *Lamiaceae* (табела 1), *Asteraceae* (табела 2) и *Rutaceae* (табела 3).

Табела 1. Садржај доминантних састојака на основу претходних испитивања хемијског састава одабраних етарских уља породице *Lamiaceae*

Етарско уље	Састојци (%)	Референца
<i>*Origanum vulgare</i> L.	карвакрол (57,3) 1,8-синеол (12,9) α -пинен (7,9)	(Baj et al., 2020)
	карвакрол (85,0)	(Proškovcová et al., 2021)
	карвакрол (>50)	(Karpiński et al., 2023)
	тимол (30,6) тимол метил етар (17,4) α -терпинен (15,7)	(Arámbula et al., 2019)
	терпинен-4-ол (24,9) γ -терпинен (10,6) <i>o</i> -цимен (8,9)	(Jnaid et al., 2016)
	узорак 1 карвакрол (80,0) узорак 2 тимол (69,0)	(Sawant & Khan, 2017)
	подврста <i>vulgare</i> гермакрен D (15,4-27,9) β -кариофилен (7,7-14,6)	(Stešević et al., 2018)

α -терпинеол (4,8-17,6) подврста <i>hirtum</i> карвакрол (74,3)	
γ -терпинен (22,9) <i>p</i> -цимен (14,7) гермакрен D (11,6)	(Jianu et al., 2023)
тимол (37,1) γ -терпинен (9,7) карвакрол (9,6)	(Vazirian et al., 2015)
кариофиленоксид (7,4-49,9) гермакрен D (8,4-22,5) (<i>E</i>)-кариофилен (8,5-10,8)	(Ilić et al., 2022)
подврста <i>glandulosum</i> узорак 1 <i>p</i> -цимен (35,7) тимол (31,8) γ -терпинен (24,2) узорак 2 тимол (43,7) γ -терпинен (27,1) <i>p</i> -цимен (12,7) узорак 3 тимол (46,1) γ -терпинен (24,0) <i>p</i> -цимен (11,5)	(Mechergui et al., 2016)
гибрид <i>viridulum</i> × подврста <i>hirtum</i> узорак 1 карвакрол (84,7) узорак 2 карвакрол (80,6) узорак 3 карвакрол (81,3)	(Zinno et al., 2023)
карвакрол (18,1-79,2) <i>p</i> -цимен (3,9-18,0) γ -терпинен (0,9-15,8)	(Morshedloo et al., 2018)
узорак 1 карвакрол (79,5) γ -терпинен (7,9) узорак 2 карвакрол (64,6) <i>p</i> -цимен (10,3) γ -терпинен (7,6)	(Laothaweerungsawat et al., 2020)
карвакрол (56,2-81,4) <i>p</i> -цимен (1,6-17,7) γ -терпинен (0,8-14,2)	(Caputo et al., 2022)

тимол (21,0-21,6) 4-терпинеол (16,3-15,9) γ -терпинен (7,6-5,5)	(Mehdizadeh et al., 2018)
<i>cis-p</i> -мент-2-ен-1-ол (33,9) линалил ацетат (13,9)	(Teles et al., 2019)
тимол (58,3) карвакрол (16,1) <i>p</i> -цимен (13,5)	(Sarikurkcu et al., 2015)
терпинеол (22,9) α -терпинен (20,6)	(Sharififard et al., 2018)
карвакрол (75,7) 1-изопропил-1-метилбензен (5,2)	(Qiao et al., 2021)
карвакрол (25,4) линалоол (9,5) тимол (7,5)	(Plata-Rueda et al., 2022)
<i>cis</i> -сабинен-хидрат (0,0-38,9) терпинеол-4-ол (4,9-25,3) карвакрол метил етар (1,7-14,2) карвакрол (1,6-13,5) γ -терпинен (3,0-12,4) тимол (0,8-11,8)	(Busatta et al., 2017)
<i>узорак 1</i> карвакрол (30,7) тимол (18,8) <i>p</i> -цимен (10,9) <i>узорак 2</i> палмитинска киселина (60,8) линолна киселина (14,3) <i>узорак 3</i> палмитинска киселина (58,2) линолна киселина (12,1)	(Han et al., 2017)
карвакрол (73,9) β -линалоол (3,5) тимол (2,3)	(Deleanu et al., 2018)
карвакрол (49,2-64,7) γ -терпинен (6,0-14,6) <i>p</i> -цимен (6,8-14,0)	(Özer et al., 2018)
γ -терпинен (30,5) карвакрол (15,7) 4-терпинеол (13,0)	(Couto et al., 2015)
карвакрол-ацетат (69,5) мета-цимен (5,4) α -терпинен (4,5)	(Dutra et al., 2019)
тимол (31,5) <i>p</i> -цимен (23,7) γ -терпинен (13,9)	(Kolypetri et al., 2023)
карвакрол (48,0) терп-1-ин-4-ол (6,8) сабинен-хидрат (6,1)	(Spyridopoulou et al., 2019)

β -кариофилен епоксид (13,3) β -кариофилен (8,2) цимен (5,2)	(Moghrovyyan et al., 2019)
карвакрол (34,0) γ -терпинен (21,6) <i>p</i> -цимен (9,4)	(Fouad et al., 2015)
терпинен-4-ол (38,4) <i>trans</i> -сабинен-хидрат (10,1)	(Fikry et al., 2019)
<i>p</i> -цимен (10,0) терпинен-4-ол (9,5) карвакрол (8,7)	(Tapiero et al., 2019)
гермакрен D (26,0-34,0) β -кариофилен (12,2-33,2) γ -элемен (3,8-16,8)	(Gonceariuc et al., 2015)
карвакрол (32,4) α -терпинеол (16,7) <i>p</i> -цимен (16,2) тимол (12,1)	(Akkaoui et al., 2020)
подврста <i>aureum</i> линалоол (25,5) <i>p</i> -цимен (20,1) γ -терпинен (15,7)	(Moisa et al., 2018)
<i>trans</i> -сабинен хидрат (17,9-27,2) терпинен-4-ол (6,2-11,1) γ -терпинен (7,0-9,8)	(Asensio et al., 2015)
тимол (36,9-60,1) γ -терпинен (11,6-24,1) <i>p</i> -цимен (2,6-9,4)	(Napoli et al., 2020)
подврста <i>gracile</i> карвакрол (46,9-52,1) подврста <i>virens</i> (<i>Z</i>)- α -бисаболен (39,2-42,7)	(Morshedloo et al., 2017)
карвакрол (36,0) тимол (25,2) <i>p</i> -цимен (21,5)	(Avola et al., 2020)
<i>trans</i> -кариофилен (30,7) сабинен (18,2) кариофилен-оксид (8,6)	(Rus et al., 2016)
тимол (35,5) γ -терпинен (19,9)	(Tanasescu et al., 2019)
карвакрол (3,0-81,4) <i>p</i> -цимен (1,8-35,6) тимол (1,9-40,9)	(Raffo et al., 2023)
узорак 1 карвакрол (35,8) <i>p</i> -цимен (17,0) γ -терпинен (13,8) узорак 2 кариофилен-оксид (18,9) (-)-спатуленол (5,4)	(Kosakowska et al., 2024)

2-ментен-1-ол (36,7) линалил-ацетат (9,3) терпинен-4-ол (9,0)	(Tejada-Muñoz et al., 2024)
карвакрол (25,6) <i>p</i> -цимен (12,3) линалоол (8,7)	(Plata-Rueda et al., 2021)
пулегон (49,3) 1,8-синеол (18,2) ментон (12,4)	(Saffarian et al., 2024)
тимол (76,0) <i>p</i> -цимен (5,7)	(Gruľová et al., 2020)
карвакрол (79,0) тимол (4,9) <i>p</i> -цимен (4,5)	(Tomanić et al., 2022)
карвакрол (80,4) <i>p</i> -цимен (4,8) тимол (4,2)	(Kovačević et al., 2021)
карвакрол (53,8) β -кариофилен (6,3)	(Almeida et al., 2022)
карвакрол (40,5) цимен (23,4) γ -терпинен (8,2)	(Silva et al., 2023)
тимол (44,17) γ -терпинен (26,09) <i>p</i> -цимен (16,03)	(D'Amato et al., 2024)
карвакрол (71,2) <i>p</i> -цимен (4,1) γ -терпинен (4,1)	(Bora et al., 2022)
карвакрол (15,2-35,0) тимол (0,5-16,05) <i>p</i> -цимен (3,5-12,2)	(Alkan, 2020)
карвакрол (61,5) γ -терпинен (14,0) β -цимен (8,6)	(Saoudi et al., 2024)
карвакрол (47,6) тимол (16,6) <i>p</i> -цимен (13,5) γ -терпинен (11,2)	(Heni et al., 2021)
карвакрол (84,4)	(Hao et al., 2021)
карвакрол (72,6) тимол (10,5)	(Ainseba et al., 2024)
карвакрол (27,6-46,6) <i>p</i> -цимен (7,8-37,1) γ -терпинен (6,8-21,5)	(Moradi et al., 2021)
подврста <i>hirtum</i> карвакрол (78,5)	(Aćimović et al., 2020)
карвакрол (67,0) <i>p</i> -цимен (7,0) γ -терпинен (5,5)	(Di Vito et al., 2020)

	узорак 1	
	α -терпинеол (18,0)	
	<i>p</i> -цимен (15,0)	
	γ -терпинен (11,0)	(Kryvtsova, 2020)
	узорак 2	
	карвакрол (55,2)	
	тимол (16,0)	
** <i>Thymus vulgaris</i> L.	тимол (75,2)	
	карвакрол (7,7)	(Baj et al., 2020)
	<i>p</i> -цимен (6,3)	
	<i>p</i> -цимен (40,0)	(Proškovcová et al., 2021)
	тимол (32,0)	
	тимол (35,7-64,7)	(Raffo et al., 2023)
	<i>p</i> -цимен (1,8-32,2)	
	<i>p</i> -цимен (30,0–40,0)	(Karpiński et al., 2023)
	тимол (<30,0)	
	тимол (27,3)	
	<i>p</i> -цимен (18,2)	(Kosakowska et al., 2024)
	γ -терпинен (11,7)	
	тимол (46,4)	
	<i>p</i> -цимен (23,8)	(Tomanić et al., 2022)
	γ -терпинен (3,5)	
	карвакрол (59,7)	
	тимол (16,5)	(Chahboun et al., 2024)
	γ -терпинен (11,1)	
	карвакрол (27,3)	(Labiad et al., 2022)
	тимол (55,9)	
	линалоол (13,7)	
	карвакрол (8,4)	(Ali, 2021)
	<i>p</i> -цимен (6,0)	
	тимол (43,3)	
	карвакрол (20,7)	(Micucci et al., 2020)
	<i>p</i> -цимен (9,4)	
	тимол (36,8)	(Moghaddam & Mehdizadeh, 2020)
	<i>p</i> -цимен (30,9)	
	карвакрол (45,5)	
	<i>o</i> -цимен (11,3)	(Dash et al., 2021)
	линалоол (9,60)	
	узорак 1	
	тимол (35,8)	
	<i>o</i> -цимен (17,2)	
	γ -терпинен (8,1)	(Chbel et al., 2022)
	узорак 2	
	борнеол (31,0)	
	α -терпинеол (15,2)	
	карвакрол (7,1)	

тимол (53,6-59,5) γ -терпинен (3,6-6,9) p -цимен (4,2-6,1)	(Jannati et al., 2021)
камфор (39,1)	(Mhiri et al., 2024)
тимол (47,4) о-цимен (16,6) γ -терпинен (7,8)	(Akermi et al., 2022)
тимол (43,6) p -цимен (22,9) бронил-ацетат (8,7)	(El-Sayed & El-Sayed, 2021)
тимол (21,5) α -пинен (17,4) о-цимен (15,4)	(Ngongang et al., 2022)
карвакрол (68,8) γ -терпинен (11,5) p -цимен (3,9)	(Drioiche et al., 2022)
кариофилен (17,9) тимол (15,1)	(Jeddi et al., 2023)
тимол (52,3-62,5)	(Bakó et al., 2023)
тимол (35,7-64,7) p -цимен (1,8-32,2)	(Raffo et al., 2023)
тимол (26,9-53,7) p -цимен (7,2-20,8) γ -терпинен (4,5-19,8)	(Najar et al., 2021)
лимонен (59,3) тимол (13,5) β -пинен (10,3)	(Sateriale et al., 2022)
карвакрол (56,8) p -цимен (12,8) γ -терпинен (11,2)	(Boukhatem et al., 2020)
тимол (38,7) p -цимен (15,7) карвакрол (14,9)	(Ed-Dra et al., 2021)
тимол (39,2) p -цимен (25,4) γ -терпинен (16,2)	(Ahmad et al., 2024)
тимол (55,8 и 54,2) p -цимен (12,9 и 20,6) γ -терпинен (15,2 и 6,0)	(Pandur et al., 2022)
тимол (41,4) камфор (38,5)	(Jaber et al., 2021)
p -цимен (26,0) карвакрол (20,7) γ -терпинен (11,3)	(Sotelo et al., 2021)

	тимол (42,9-53,6) <i>p</i> -цимен (14,3-25,5) γ -терпинен (6,6-15,5)	(Dobрева et al., 2024)
	тимол (46,0) <i>p</i> -цимен (25,1) γ -терпинен (9,0)	(Zanotto et al., 2023)
	линалоол (9,6-36,7) (<i>Z</i>)-сабинен-хидрат (7,4-21,5) терпинен-4-ол (3,9-18,7)	(Capdevila et al., 2025)
	„English Winter“ 2016. година тимол (45,0) <i>p</i> -цимен (7,6) γ -терпинен (7,1) карвакрол (5,1)	„English Winter“ 2017. година тимол (38,1) <i>p</i> -цимен (10,3) γ -терпинен (6,7) карвакрол (8,3) (Wesołowska & Jadczak, 2019)
	„Summer Thyme de Provence“ 2016. година тимол (36,8) <i>p</i> -цимен (15,7) γ -терпинен (5,3) карвакрол (6,5)	„Summer Thyme de Provence“ 2017. година тимол (37,3) <i>p</i> -цимен (11,2) γ -терпинен (11,1) карвакрол (5,4) (Wesołowska & Jadczak, 2019)
<i>Satureja montana</i> L.	карвакрол (23,9–29,0) тимол (14,5–16,5) линалоол (16,0–16,4) γ -терпинен (12,3–15,0) <i>p</i> -цимен (9,4–12,3) 1,8-синеол (6,2–6,8)	(Maccelli et al., 2019)
	линалоол (15,4-32,6) <i>cis</i> -сабинен-хидрат (3,5-23,5) карвакрол (н.д.-24,5)	(Mihajilov-Krstev et al., 2014)
	тимол (44,6) <i>p</i> -цимен (13,4) карвакрол (6,2)	(Nikolić et al., 2014)
	карвакрол (55,01) <i>p</i> -цимен (14,7) γ -терпинен (11,1)	(Kovačević et al., 2021)
	α -терпинеол (14,7) <i>cis</i> -сабинен-хидрат (21,8) <i>p</i> -цимен (17,9)	(Čopra-Janićijević et al., 2020)
	<i>p</i> -тимол (81,8) линалоол (2,1)	(Hudz et al., 2020)
	карвакрол (65,3-77,4) <i>p</i> -цимен (3,2-10,0) γ -терпинен (2,1-6,6)	(Said-Al Ahl et al., 2024)
	узорак I (континентална) <i>cis</i> -сабинен-хидрат (24,8) гермакрен D (3,1) бициклогермакрен (2,7)	(Dodoš et al., 2021)

узорак 2 (приморска)	
тимол (40,5)	
γ -терпинен (18,8)	
<i>p</i> -цимен (11,9)	
карвакрол (35,7)	(Aćimović et al., 2022)
<i>p</i> -цимен (32,3)	
γ -терпинен (10,5)	
карвакрол (58,3-87,0)	(Pokajewicz et al., 2023)
<i>p</i> -цимен (5,0-8,8)	
линалоол (3,9-75,8)	(Capdevila et al., 2025)
карвакрол (0,2-45,9)	
<i>p</i> -цимен (н.д.-31,1)	
карвакрол (55,0)	(Kovačević et al., 2021)
<i>p</i> -цимен (14,7)	
γ -терпинен (11,1)	
подврста <i>variegata</i>	
карвакрол (22,5)	
<i>p</i> -цимен (17,6)	
тимол (17,4)	
γ -терпинен (9,1)	(Caprioli et al., 2019)
карвакрол метил етар (7,1)	
подврста <i>montana</i>	
карвакрол (61,9)	
<i>p</i> -цимен (9,9)	
γ -терпинен (8,2)	

**O. vulgare* L. преглед резултата научних истраживања у периоду од 2015-2025. године

***T. vulgaris* L. преглед резултата научних истраживања у периоду од 2015-2025. године

На основу прегледане доступне научне литературе можемо закључити да су карвакрол, *p*-цимен и γ -терпинен били најчешће идентификовани доминантни састојци хемијског састава етарског уља *O. vulgare*. Досадашњим истраживањима је утврђено да су тимол и *p*-цимен представљали главни састојци етарског уља *T. vulgaris*, док су најзаступљенији састојци уља *S. montana* биле карвакрол и тимол. Генерално, етарска уља представника биљака породице Lamiaceae садрже висок проценат карвакрола, тимола и *p*-цимена (Aćimović et al., 2022; Akermi et al., 2022; Caprioli et al., 2019; Caputo et al., 2022; Dobrev et al., 2024; Dodoš et al., 2021; Kovačević et al., 2021; Maccelli et al., 2019; Pokajewicz et al., 2023; Sotelo et al., 2021; Tapiero et al., 2019; Wesołowska & Jadczyk, 2019).

Табела 2. Садржај доминантних састојака на основу претходних испитивања хемијског састава одабраних етарских уља породице Asteraceae

Етарско уље	Састојци (%)	Референца
<i>Inula helenium</i> L.	алантолактон (55,8) изоалантолактон (26,1) диплофилин (5,1)	(Stojanović-Radić et al., 2012)
	узорак 1 (корен) алантолактон (11,0) виридифлорол (3,4) 1,5-циклооктадиен, 3,4-диметил (3,4) 11 α ,13-дихидроелемастеирактинолид (2,9) 11 α ,13-дихидроалантолактон (2,9)	(Ergashboevna et al., 2024)
	узорак 2 (лист) d-3-карен (7,7) палмитинска киселина (7,4) бензен, 1,3-бис(1,1-диметилетил)-2-метокси-5-метил- (6,6)	
	алантолактон (50,4) изоалантолактон (35,5)	(Staicu et al., 2023)
	екстракти алантолактон (35,3) изоалантолактон (54,7)	(Wang et al., 2018)
	алантолактон (52,4) изоалантолактон (33,0)	(Bourrel et al., 1993)
	хексадеканска киселина (12,4) 1,8-синеол (9,1) β -бурбонен (4,8)	(Sen et al., 2019)
	узорак 1 висок садржај сесквитерпена α -бисаболол (30,1) 12-карбоксиеудесма-3,11(13)-диен (14,9)	(Güleç et al., 2024)
	узорак 2 висок садржај монотерпена α -пинен (8,9) 1,8-синеол (9,5)	
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	висок садржај сесквитерпена α -цедрен (13,6) α -куркумен (11,4) церанил-ацетат (10,1) лимонен (6,1) нерол (5,0) нерил-ацетат (4,9) α -пинен (3,8)	(Djihane et al., 2017)

α -пинен (29,2) γ -куркумен (18,2) β -селинен (7,7) нерил-ацетат (5,0)	(Bacic et al., 2021)
сесквитерпени (%) Франуцска (45,2) Корзика (47,9) Босна (54,8) доминантни састојци (%) нерил-ацетат (4,0-14,9) β -химахален (9,9-10,9)	(Zheljazkov et al., 2022)
α - и γ -куркумен (12,5–25,8) нерил-ацетат (12,0–20,6) α -пинен (5,6–19,5)	(Tzanova et al., 2018)
γ -куркумен (13,6) β -селинен (12,2) α -пинен (11,8) β -кариофилен (6,7) <i>ar</i> -куркумен (5,0)	(Aćimović et al., 2021)
α -пинен (21,6) нерил-ацетат (7,9)	(Staver et al., 2018)
<i>узорак 1</i> α -пинен (20,8) γ -куркумен (16,5) β -селинен (5,6) <i>узорак 2</i> нерил-ацетат (33,9) γ -куркумен (8,8)	(Mollova et al., 2020)
нерил-ацетат (28,2) γ -куркумен (18,8)	(Kladar et al., 2015)
α -пинен (15,7) γ -куркумен (12,8)	(Talić et al., 2019)
<i>узорак 1</i> нерил-ацетат (20,3) α -пинен (10,4) <i>узорак 2</i> нерил-ацетат (16,4) α -пинен (4,1)	(Węglarz et al., 2022)
β -еудесмен (21,7) β -бисаболен (19,9)	(Oliva et al., 2020)
α -пинен (16,6) γ -куркумен (14,1) β -селинен (7,4)	(Hadžibeti et al., 2024)
нерил-ацетат (20,4) γ -куркумен (14,1)	(Dzamic et al., 2019)
нерил-ацетат (15,8) α -пинен (8,2)	(Fraternale et al., 2019)

нерил-ацетат (34,0)	(Gismondi et al., 2020)
α -пинен (28,5)	
нерол (8,0)	
нерил-ацетат (4,5-21,4)	(Glumac et al., 2023)
α -пинен (4,0-12,6)	
<i>ar</i> -куркумен (5,9-10,7)	
нерил-ацетат (15,6)	(Servi & Servi, 2022)
α -пинен (11,5)	
γ -куркумен (11,3)	
нерил-ацетат (32,8)	(Lemaire et al., 2023)
γ -куркумен (12,3)	
γ -куркумен (16,0)	(Ferraz et al., 2022)
(-)-италицен (12,5)	

На основу прегледане претходне научне литературе можемо закључити да су сесквитерпени, алантолактон и изоалантолактон, били најчешће идентификовани доминантни састојци хемијског састава етарског уља *I. helenium*. Досадашњим истраживањима је утврђено да су нерил-ацетат и α -пинен представљали главне састојке етарског уља *H. italicum*. Генерално, етарска уља представника биљака породице Asteraceae садрже висок проценат сесквитерпенских лактона и монотерпена (Djihane et al., 2017; Ergashboevna et al., 2024; Gismondi et al., 2020; Hadžibeti et al., 2024; Staicu et al., 2023; Staver et al., 2018; Stojanović-Radić et al., 2012; Talić et al., 2019).

Табела 3. Садржај доминантних састојака на основу претходних испитивања хемијског састава одабраних етарских уља породице Rutaceae

Етарско уље	Састојци (%)	Референца
<i>Citrus aurantium</i> L. .	лимонен (27,5)	(Ammar et al., 2012)
	(<i>E</i>)-неролидол (17,5)	
	α -терпинеол (14,1)	
	α -терпинил-ацетат (11,7)	
	(<i>E,E</i>)-фарнезол (8,0)	
	лимонен (33,4–89,2)	(Badalamenti et al., 2022)
	α -пинен (1,7-3,0)	
	β -мирцен (1,0-7,5)	
	β -линалоол (1,0-7,7)	
	узорак 1	(Hojjati et al., 2016)
	лимонен (59,9)	
	алоаромадендрен (5,9)	
	β -мирцен (3,9)	
	<i>cis</i> -лимонен-оксид (3,6)	
	узорак 2	

лимонен (81,6) β -мирцен (5,7) узорак 3 линалоол (32,6) α -терпинеол (17,2) линалил-ацетат (13,3)	
лимонен (93,9) β -мирцен (3,1) α -пинен (1,0)	(Vukić et al., 2023)
линалоол (15,8) α -терпинеол (4,9)	(Değirmenci & Erkurt, 2020)
узорак 1 1,8-синеол (69,9) α -терпинил-ацетат (9,9) узорак 2 линалоол-ацетат (64,1) линалоол (24,0)	(Elhawary et al., 2024)
узорак 1 и 2 сабинен (33,2-44,8) E - β -оцимен (7,6-8,2) узорак 3 δ -3-карен (12,8)	(Mejri et al., 2022)
лимонен (98,7-99,2) β -мирцен (0,5-0,8)	(Ashmawy et al., 2024)
линалил-ацетат (33,0) линалоол (30,6) α -терпинеол (9,6)	(Oulebsir et al., 2022)
лимонен (50,5) линалоол (9,9) β -оцимен (7,8)	(Benzaid et al., 2021)
узорак 1 лимонен (72,5) гексасилоксан (13,8) узорак 2 лимонен (77,3) гексасилоксан (6,2) узорак 3 лимонен (79,8) узорак 4 лимонен (95,7)	(Sevindik et al., 2021)
лимонен (89,8-95,4) мирцен (1,4-1,9) β -пинен (0,2-1,5)	(Ferrer et al., 2021)
линалоол (29,0) 2E,6E-фарнезол (12,8) линалоол-ацетат (12,5) E -неролидол (6,9) лимонен (6,4)	(Ailli et al., 2023)

	линалил-ацетат (42,3) линалоол (29,8)	(Elgat et al., 2020)
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	лимонен (63,4) нерол (7,1) гераниол (6,2) гераниал (4,4) нерал (3,3) β -оцимен (2,3)	(Al-Aamri et al., 2018)
	лимонен (62,2) γ -терпинен (12,4)	(Dao et al., 2022)
	лимонен (49,3) β -пинен (21,7) γ -терпинен (9,0)	(Tavallali et al., 2021)
	лимонен (29,7) β -пинен (26,3) цитрал (9,9)	(Permadi et al., 2024)
	α -феландрен (48,5) p -цимен (16,5)	(Galovičová et al., 2022)
	нерал (30,7) лимонен (22,8) цитрал (19,4)	(Rana et al., 2025)
	лимонен (48,8-69,2) β -оцимен (4,6-16,7) γ -терпинен (5,4-8,4)	(Uahomo et al., 2023)
	лимонен (28,9) α -терпинен (15,7) γ -терпинен (12,7)	(Safaeian Laein et al., 2021)
	лимонен (45,9) β -пинен (20,3) γ -терпинен (8,3)	(Thonglem et al., 2023)
	лимонен (25,5) γ -терпинен (11,3) α -цитрал (9,7)	(Mohammed et al., 2024)
<i>Citrus limon</i> L.	лимонен (60,7) β -пинен (12,6) γ -терпинен (10,3)	(Kačániová et al., 2024)
	лимонен (48,6-53,4) β -пинен (17,4-18,3) γ -терпинен (12,3-12,8)	(El Aboubi et al., 2023)
	лимонен (55,4) нерал (10,4)	(Paw et al., 2020)
	лимонен (68,7) γ -терпинен (10,8)	(Akarca & Sevik, 2021)

	лимонен (12,3-49,6) цитронелал (5,4-78,7) цитронелол (3,0-7,2)	(Wu et al., 2021)
	лимонен (47,3) γ -пинен (10,6) β -пинен (13,7)	(Li et al., 2022)
	сабинен (29,5) 3-карен (7,18) лимонен (7,9)	(Asker et al., 2020)
	лимонен (60,6) β -пинен (13,3)	(Hamdi et al., 2023)
<i>Citrus paradisi</i> L.	лимонен (75,1) β -мирцен (7,3) α -пинен (2,1)	(Okunowo et al., 2013)
	лимонен (81,9) β -лаурен (5,4)	(Li et al., 2022)
	лимонен (86,8) <i>trans</i> -лимонен-оксид (2,4)	(Hamdi et al., 2023)
	лимонен (85,5-87,5)	(Kaouthar et al., 2020)
	лимонен (94,4) мирцен (1,9)	(Delgado et al., 2020)
	лимонен (53,8) нооткатон (22,1)	(Sajid et al., 2024)

На основу прегледане доступне научне литературе можемо закључити да је најчешће идентификовани доминантни састојак хемијског састава етарских уља породице Rutaceae био монотерпен лимонен (Dao et al., 2022; Hamdi et al., 2023; Kačániová et al., 2024; Kaouthar et al., 2020; Li et al., 2022; Okunowo et al., 2013; Paw et al., 2020; Permadi et al., 2024; Sajid et al., 2024; Tavallali et al., 2021; Wu et al., 2021). У зависности од биљне врсте била је различита и његова процентуална заступљеност у узорку, па је код етарског уља *C. paradisi* износила чак 94,4% (Delgado et al., 2020). Посматрајући досадашња истраживања хемијских профила етарског уља *C. aurantium*, као доминантни састојак може се издвојити и једињење линаоол чија је заступљеност била и до 32,6% (Hojjati et al., 2016).

У овој докторској дисертацији испитиван је и антифунгални ефекат етарских уља добијених из различитих делова одабраних биљака, стога је у табелама 4, 5 и 6 дат преглед доступних публикованих научних резултата досадашњих испитивања анти-*Candida* активности одабраних уља три породице: Lamiaceae (табела 4), Asteraceae (табела 5) и Rutaceae (табела 6).

Табела 4. Преглед претходних испитивања анти-*Candida* активности одабраних етарских уља породице Lamiaceae

Етарско уље	Тест	Вредности	Референца
* <i>Origanum vulgare</i> L.	микродилуција	<i>C. albicans</i> и <i>C. glabrata</i> МИК (0,25-0,50 mg/mL)	(Baj et al., 2020)
	микродилуција	МИК (0,40 mg/mL)	(Proškovcová et al., 2021)
	микродилуција	МИК (6,25 mg/mL)	(Karpiński et al., 2023)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 90029 МИК ₅₀ (0,01 µg/mL) <i>C. albicans</i> ATCC 10231 МИК ₅₀ (0,97 µg/mL) <i>C. dubliniensis</i> ATCC CD36 МИК ₅₀ (2,6 µg/mL) <i>C. krusei</i> ATCC 6258 МИК ₅₀ (5,3 µg/mL)	(Cid-Chevecich et al., 2022)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 90028 МИК (12,5 µL/mL)	(de Andrade et al., 2023)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 МИК (2,5 µg/mL) <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 МИК (2,5 µg/mL)	(Bora et al., 2022)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> МИК ₅₀ = 200 µg/mL МИК ₉₀ = 200 µg/mL МИК распон=150–250 µg/mL	(Vahedi et al., 2016)
	диск дифузија	<i>C. albicans</i> МИК (0,25 – 0,007% v/v)	(Diab et al., 2024)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> МИК ₅₀ (6,25 mg/mL) МИК ₉₀ (6,25 mg/mL)	(Vácz et al., 2024)

микродилуција	<i>Candida</i> spp. МИК (0,12-0,25% v/v)	(Mandras et al., 2021)
диск дифузија	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 МИК (4 µg/mL)	(Ermenlieva et al., 2022)
микродилуција	<i>Candida</i> spp. МИК (0,6-125,0 µL/mL)	(Abdulmajeed, 2015)
микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 МИК (1-4 µg/mL)	(Mihaylova et al., 2022)
**<i>Thymus vulgaris</i> L.		
микродилуција	МИК (mg/mL) највиша (5,73) доминантна (0,73)	(Gucwa et al., 2018)
микродилуција	<i>Candida</i> spp. МИК (0,12-0,25% v/v)	(Mandras et al., 2021)
микродилуција	<i>C. albicans</i> и <i>C. glabrata</i> МИК (250-500 mg/L)	(Baj et al., 2020)
микродилуција	МИК (0,40 mg/mL)	(Proškovcová et al., 2021)
микродилуција	МИК (6,25 mg/mL)	(Karpiński et al., 2023)
микродилуција	<i>C. albicans</i> МИК ₅₀ (50 mg/mL) МИК ₉₀ (50 mg/mL)	(Vácz et al., 2024)
диск дифузија	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 МИК (2 µg/mL)	(Ermenlieva et al., 2022)
диск дифузија	<i>C. auris</i> NCPF 8971 зона инхибиције - 59,75 mm	(Ribeiro et al., 2022)
диск дифузија агар дилуција	<i>Candida</i> spp. зона инхибиције распон 34–60 mm МИК (0,3–0,15 µL/mL)	(Boukhatem et al., 2020)
микродилуција	<i>C. albicans</i> МИК (0,031 µg/mL) <i>C. glabrata</i> МИК (0,0625 µg/mL)	(Moazeni et al., 2021)
микродилуција	<i>C. albicans</i> МИК (0,6-1,25 µL/mL)	(Alshaikh & Perveen, 2021)
микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 МИК (1-4 µg/mL)	(Mihaylova et al., 2022)
микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 14053 МИК (0,0018 mg/mL)	(Micucci et al., 2020)
микродилуција	<i>Candida</i> spp. МИК (150-1200 µg/mL)	(Driouche et al., 2022)
микродилуција	<i>Candida</i> spp. МИК (0,004-0,078 mg/mL)	(Hajlaoui et al., 2021)

<i>Satureja montana</i> L.	микродилуција	МИК (0,9 - 1,0 µg/mL)	(Nikolić et al., 2014)
	микродилуција	<i>Candida</i> spp. МИК (≤ 32,9 µg/mL)	(Kremer et al., 2015)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 МИК (0,35 – 3,13 µL/mL)	(Mihajilov-Krstev et al., 2014)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 вагинални изолати <i>Candida</i> 100% инхибиција	(Aćimović et al., 2022)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> и <i>C. glabrata</i> МИК (250-500 mg/L)	(Baj et al., 2020)
	диск-дифузија	<i>C. albicans</i> МИК ₅₀ (22,18 mg/mL) МИК ₉₀ (22,35 mg/mL) <i>C. glabrata</i> МИК ₅₀ (23,43 mg/mL) МИК ₉₀ (23,74 mg/mL)	(Said-Al Ahl et al., 2024)

**O. vulgare* L. преглед резултата научних истраживања у периоду од 2015-2025. године

***T. vulgaris* L. преглед резултата научних истраживања у периоду од 2015-2025. године

Утврђене зоне инхибиције и минималне инхибиторне концентрације испитиваних уља оригана, тимијана и ртањског чаја, биле су различите у зависности од врсте и осетљивости/резистентности испитиваних сојева. На основу прегледане доступне научне литературе може се закључити да етарска уља *O. vulgare*, *T. vulgaris* и *S. montana* поседују изражен анти-*Candida* потенцијал (Aćimović et al., 2022; Baj et al., 2020; Bora et al., 2022; Drioiche et al., 2022; Hajlaoui et al., 2021; Karpiński et al., 2023; Micucci et al., 2020; Mihajilov-Krstev et al., 2014; Mihaylova et al., 2022; Proškovcová et al., 2021; Váczi et al., 2024).

Табела 5. Преглед претходних испитивања анти-*Candida* активности одабраних етарских уља породице Asteraceae

Етарско уље	Тест	Вредности	Референца
<i>Inula helenium</i> L.	микродилуција	сој <i>C. albicans</i> МИК 62,5 µg/mL	(Bourrel et al., 1993)
	микродилуција	клинички изолат <i>C. albicans</i> МИК 40 µg/mL	(Žugić et al., 2013)

	микродилуција	клинички изолати <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilopsis</i> , <i>C. tropicalis</i> МИК 0,0009 - 0,6 µg/mL	(Deriu et al., 2008)
	микродилуција	екстракт <i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> МИК ≥100 µg/mL	(Budán et al., 2021)
<i>Inula oculus-christi</i> L.	микродилуција	екстракти <i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>C. albicans</i> ATCC 90028 <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 <i>C. utilis</i> NRRL Y-900 <i>C. krusei</i> 6258 МИК распон 39 до 1000 µg/mL	(Saltan et al., 2022)
<i>Inula germanica</i> L.	микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>C. utilis</i> NRRL Y-900 <i>C. glabrata</i> ATCC 2001 <i>C. tropicalis</i> ATCC 1369 <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 <i>C. krusei</i> 6258 МИК распон 125 до 1000 µg/mL	(Güleç et al., 2024)
алантолактон	микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>C. albicans</i> SC5314 <i>C. krusei</i> 6258 <i>C. tropicalis</i> ATCC 7349 <i>C. glabrata</i> ATCC 2001 МИК распон 18 до 72 µg/mL	(Yang et al., 2022)
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don	микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 МИК (6,325 µg/mL)	(Djihane et al., 2017)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> МИК 6,4 mg/mL	(Staver et al., 2018)
	диск-дифузија	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 зона инхибиције 8,5 mm	(Bacic et al., 2021)
	диск-дифузија	<i>C. albicans</i> CCM 8186 зона инхибиције (5,33-5,67 mm) <i>C. krusei</i> CCM 8271 зона инхибиције (4,67-10,67 mm) <i>C. tropicalis</i> CCM 8223 зона инхибиције (4,33-6,33)	(Zheljazkov et al., 2022)

Посматрајући податке приказане у табели 5, можемо приметити да постоји ограничен број истраживања о инхибиторној активности уља омана и смиља, представника биљака породице Asteraceae. Утврђене зоне инхибиције и минималне инхибиторне концентрације биле су различите у зависности од врсте и осетљивости/резистентности испитиваних сојева. Преглед досадашњих резултата испитивања антифунгалне активности етарских уља *I. helenium* и *H. italicum* имплицира да поседују изражен анти-*Candida* потенцијал (Bacic et al., 2021; Budán et al., 2021; Deriu et al., 2008; Djihane et al., 2017; Zheljazkov et al., 2022).

Табела 6. Преглед претходних испитивања анти-*Candida* активности одабраних етарских уља породице Rutaceae

Етарско уље	Тест	Вредности	Референца
<i>Citrus aurantium</i> L.	микродилуција	<i>C. albicans</i> МИК распон 0,0015 до 0,0031 mg/mL	(Nidhi et al., 2020)
	диск-дифузија	<i>C. albicans</i> зона инхибиције 25,3 ± 0,47 mm	
	микродилуција	<i>C. albicans</i> <i>C. krusei</i> МИК распон 1,25 до 40 mg/mL	(Gniewosz et al., 2017)
	диск-дифузија	<i>C. albicans</i> зона инхибиције 14,3 ± 0,58 mm	(Chintaluri et al., 2015)
	диск-дифузија	<i>S. cerevisiae</i> зона инхибиције 20 mm <i>C. albicans</i> зона инхибиције 22 mm	(Ammar et al., 2012)
	микродилуција	метанолни екстракт <i>C. albicans</i> МИК распон (1024-4096 µg/mL)	(Sheikhi et al., 2023)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. kefyr</i> <i>C. parapsilopsis</i> МИК распон 0,6 – 5 mg/mL	(Ailli et al., 2023)

<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	микродилуција	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 МИК 0,00125 mg/mL клиничке изолати МИК 0,000625 до 0,0025 mg/mL	(Costa et al., 2014)
	диск-дифузија	<i>C. albicans</i> зона инхибиције 36,7±0,58 mm	(Chintaluri et al., 2015)
	диск-дифузија	<i>C. albicans</i> зона инхибиције 17 mm	(Mohammed et al., 2024)
<i>Citrus limon</i> L.		<i>Candida</i> spp. МИК (0,2-0,5 µg/mL)	(Perić et al., 2019)
	микродилуција	<i>Candida</i> spp. МИК (6,25-12,5 mg/mL)	(Hamdi et al., 2023)
	микродилуција	<i>C. albicans</i> МИК (0,625 µL/mL)	(Petretto et al., 2023)
<i>Citrus paradisi</i> L.	диск-дифузија	<i>C. albicans</i> зона инхибиције 14 mm	(Mohammed et al., 2024)
	диск-дифузија	метанолни екстракт <i>C. albicans</i> концентрација - зоне инхибиције 80 µg/mL – 11,00 mm 40 µg/mL – 10,02 mm 8 µg/mL – 9,60 mm	(Okunowo et al., 2013)
	микродилуција	<i>Candida</i> spp. МИК (1,2 mg/mL)	(Hamdi et al., 2023)

Посматрајући податке приказане у табели 6, можемо приметити да постоји ограничен број истраживања о инхибиторној активности уља цитруса, представника биљака породице Rutaceae. Утврђене зоне инхибиције и минималне инхибиторне концентрације биле су различите у зависности од биљне врсте и осетљивости/резистентности испитиваних сојева. Досадашња истраживања су показала да етарска уља *C. aurantium*, *C. aurantifolia*, *C. limon* и *C. paradisi* поседују изражен анти-*Candida* потенцијал (Ailli et al., 2023; Costa et al., 2014; Gniewosz et al., 2017; Hamdi et al., 2023; Mohammed et al., 2024; Nidhi et al., 2020; Perić et al., 2019; Petretto et al., 2023).

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Клинички изолати рода *Candida* spp.

Сојеви коришћени у нашој студији изоловани су из различитог људског материјала (узорак столице, грла, вагине и цервикса) и идентификовани као *C. albicans* и *C. krusei* према културним и биохемијским карактеристикама. У овом истраживању коришћен је један референтни сој *C. albicans* ATCC 24433. У лабораторији за микробиологију (Департман за биологију и екологију Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу) чувано је 20 сојева *Candida* различитог порекла.

Табела 7. Први сет хуманих изолата *Candida* различитог порекла

Изолати		Порекло
1	<i>Candida albicans</i>	столица
2	<i>Candida albicans</i>	цервикс
3	<i>Candida krusei</i>	вагина
4	<i>Candida albicans</i>	столица
5	<i>Candida albicans</i>	столица
6	<i>Candida albicans</i>	ATCC
7	<i>Candida krusei</i>	грло
8	<i>Candida albicans</i>	столица
9	<i>Candida albicans</i>	цервикс
10	<i>Candida krusei</i>	столица
11	<i>Candida albicans</i>	столица

Током нашег истраживања коришћена су два сета изолата који су тестирани у различитим фазама рада. У првом делу тестирано је десет хуманих клиничких изолата узоркованих из различитих регија тела где је била потврђена кандидоза (табела 7), док су касније испитани узорци *Candida* били искључиво изоловани из гениталног тракта жена (табела 8). Циљ је био пронаћи природни производ који би био значајно ефикасан као анти-

Candida агенс са карактеристикама инхибиције раста и развоја применом ниских концентрација који би потенцијално био детаљније испитиван у будућим истраживањима.

Табела 8. Други сет хуманих изолата *Candida* вулвовагиналног порекла

Изолати		Порекло
1	<i>Candida krusei</i>	вагина
2	<i>Candida albicans</i>	вагина
3	<i>Candida albicans</i>	вагина
4	<i>Candida krusei</i>	вагина
5	<i>Candida albicans</i>	вагина
6	<i>Candida krusei</i>	вагина
7	<i>Candida albicans</i>	ATCC
8	<i>Candida krusei</i>	вагина
9	<i>Candida albicans</i>	вагина
10	<i>Candida albicans</i>	вагина
11	<i>Candida krusei</i>	вагина

4.1.1. Подлоге и реагенси

Културе су одржаване на Сабуро декстрозном агару (HiMedia, Mumbai, India) и Кандида Хромогеном Агару (HiCrome™ *Candida* Differential Agar; HiMedia) на оптималној температури (30-35 °C). Течне хранљиве подлоге коришћене током реализације експеримената били су Сабуро декстрозни бујон (HiMedia, Mumbai, India) и RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), обе адекватне врстама микроорганизама које су биле део овог истраживања.

Сабуро декстрозни агар (СДА) – хранљива подлога која садржи 4% декстрозе и користи се за изолацију и култивисање гљива. Састав подлоге на 1000 mL дестиловане воде је следећи: пепсин 10,0 g, декстроза 40,0 g и агар 15,0 g. Након адекватне припреме подлога

се стерилише у аутоклаву 15 минута на 121 °C. По завршеној стерилизацији, охлади се на 50 °C и разлије у Петријеве плоче. Након очвршћавања и провере стерилности подлога је спремна за употребу и служи за припрему преконоћних култура.

Кандида Хромогени Агар – хранљива подлога која се користи за идентификацију и култивацију квасаца рода *Candida*. Хромогеност подлоге огледа су добијању различитих боја колонија у зависности од инокулисане врсте и при томе је могуће у кратком временском року извршити прелиминарну идентификацију квасаца.

Сабуро декстрозни бујон (СДБ) – течна хранљива подлога са 2% декстрозе, намењена култивисању фунгалних микроорганизама. Састав подлоге на 1000 mL је: пепсин 10,0 g и декстроза 20,0 g. Раст микроорганизама у бујону манифестује се као замућење. Подлога се употребљава приликом реализације метода за испитивање инхибиторне активности гљива (квасаца).

RPMI-1640 – течна хранљива подлога која у свом саставу садржи суплементе који омогућавају бољи раст и размножавање квасаца. Ова обогаћена подлога је коришћен за извођење методе испитивања продукције/редукције биофилм ћелија *Candida* и герминационих способности врсте *C. albicans*.

Фосфатни пуфер (Phosphate Buffer Saline - **PBS**, pH 7.4) је припремљен по адекватној рецептури (sastav ovog pufera на 1000 mL: natrijum-hlorid (NaCl) - 8,0 g, kalijum-hlorid (KCl) - 0,20 g, Na₂HPO₄ - 1,44 g и KH₂PO₄ - 0,24 g) и подешена је одговарајућа pH вредност како би се даље користио у оквиру експерименталног дела кристал виолет (КВ) методе.

Диметил-сулфоксид (ДМСО) је органски растварач који је употребљаван за припремање основних раствора узорака етарских уља који су потом коришћени у експериментима различите методологије.

Кристал виолет боја је припремљена у виду 0,5% раствора употребом стерилне дестиловане воде, као и прашкастог дела боје у одговарајућој количини. Раствор боје је коришћен приликом бојења у току експерименталног тестирања продукције/редукције биофилма.

Физиолошки раствор је припремљен у виду 0,9% концентрације при чему је коришћен приликом припреме суспензија квасаца и подешавања њихове густине на денситометру.

4.2. Биљни материјал

Етарска уља биљака *O. vulgare*, *T. vulgaris* и *H. italicum* коришћена у студији била су комерцијално доступна и купљена у локалној продавници у Нишу, Србија. Уља су добијена дестилацијом биљне врсте *H. italicum*, *O. vulgare* и *T. vulgaris* које су претходно плантажно гајене (Siempre Viva Oils, Нишки округ, Србија). Уља цитруса су, такође, била комерцијално доступни узорци који су набављени у локалној продавници (*C. limon* - Alekpharm, Нишки округ; *C. aurantifolia* – Alekpharm, Нишки округ, Србија; *C. aurantium* – Kirkarpharma, Нишки округ, Србија; *C. paradisi* - Kirkarpharma, Нишки округ, Србија). Узорци су припремљени у растварачу диметил сулфоксид (ДМСО) за даљу употребу у експериментима.

4.3. Поступак припреме узорака

4.3.1. Хидродестилација етарских уља *I. helenium* и *S. montana*

Биљни материјал *I. helenium* и *S. montana* купљен је у локалној апотеци у Нишу и коришћен је за хидродестилацију етарских уља (Нишки округ, Србија). Сасушен материјал је припремљен непосредно пре дестилације у виду ситно исецканих комадића.

Припремљен биљни материјал као што је претходно описано стављен је у балон за дестилацију а потом је додата одређена количина воде. Након тога повезана је апаратура по Клевенџеру (Clevenger, 1928) која се састоји од кондензора, бочне цеви са чепом и цеви која служи за мерење волумена дестилата. Процес дестилације одвијао се у периоду од 3,5 сата. Након завршеног процеса, уље омана је екстраховано уз помоћ етра а потом одстрањен вишак воде анхидрованим магнезијум-сулфатом ($MgSO_4$). Следећи поступак био је процес филтрације у коме се одстрањују остаци магнезијум-сулфата, а етар је евапорисан уз помоћ вакуум упаривача. Овом комплексном процедуром добијено је чисто етарско уље чија је маса мерена на аналитичкој ваги. Принос уља изражен је у тежинским процентима (w/w) на основу 100 g биљног материјала. Одређена количина етарског уља узета је за потребе

хемијских анализа (гасна хроматографија), а остатак узорка чуван је у посебно заптивеним киветама на 4 °C (Stojanović-Radić et al., 2012).



Слика 12. Приказ апаратуре по Клевенцеру коришћен за добијање етарских уља

4.4. Методе

4.4.1. Хемијска анализа (гасна хроматографија са пламено-јонизационим детектором - GC/FID и гасна хроматографија са масеним детектором - GC/MS)

Употребом гасне хроматографије са пламено-јонизационим детектором (GC/FID) и гасне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом (GC/MS) идентификовани су састојци свих етарских уља тестираних у овом раду. GC/MS анализе (извршене у три понављања) су спроведене коришћењем гасног хроматографа фирме Hewlett-Packard 6890N опремљеног са капиларном колоном DB-5MS (5,0% фенидиметилсилоксан, 30 m x 0,25 mm, дебљина филма 0,25 μ m, Agilent Technologies, САД) који је је био повезан са масеним детектором Hewlett-Packard 5975B. Температуре ињектора и интерфејса су биле подешене на 250 °C и 300 °C. Носећи гас који је употребљен био је хелијум протока од 1,0 mL/min. Температурно програмирање било је подешено од 70 °C до 290 °C са стопом пораста од 5 °C/мин. Узорци (1,0 μ L раствора етарског уља, припремљени растварањем 10,0 mg етарског уља у 1,0 mL диетил-етра) су ињектирани у пулсном режиму (са почетном брзином протока од 1,5 mL/мин током 0,5 минута, а затим је проток смањен на 1,0 mL/мин током остатка анализе, сплит однос 40:1). Услови MS детектора укључивали су напон јонизације од 70 eV,

опсег аквизиције вредности масе од m/z 35-650 и брзина скенирања од 0,32 секунде. Под оптималним условима вршена је анализа GC/FID и гасна хроматографија са масеним детектором GC/MS израчунат је процентуални састав етарских уља на основу површина GC пикова без корекције. Састојци су идентификовани поређењем њихових ретенционих индекса (у односу на C_8 - C_{40} *n*-алкане на истој колони) са литературним вредностима (Adams, 2007), односно поређењем са онима аутентичних стандарда, као и оних из база података као што је Wiley 6, NIST11 (NIST Mass Spectrometry Data Center, William E. Wallace, n.d.) и MassFinder 2.3 и MS библиотеку саме лабораторије која садржи спектре познатих уља и чистих супстанци. Где год је то било могуће, идентификација је даље потврђена коинјекцијом стандардима.

4.4.2. Испитивање анти-*Candida* активности одабраних етарских уља

4.4.2.1. Микродилуциона метода

Метода микродилуције употребљава се за одређивање постојања антимикробне активности супстанце која се тестира, као и прецизне концентрације њеног деловања (Stojanović-Radić et al., 2012). Од преконоћних култура сојева који су изабрани за тестирање и претходно узгајани на Сабуро декстрозном агару, направљене су суспензије квасаца у стерилном 0,9% физиолошком раствору. Микротитар плоче садрже 96 бунарчића распоређених у 12 колона и 8 редова. Након подешавања суспензија тако да њихов турбидитет износи 0,5 McFarland јединица, што је одговарајуће концентрацији квасаца од $1-5 \times 10^7$ CFU/mL (*Colony Forming Unit*), суспензије су коришћене за инокулисање припремљеног стерилног бујона који представља основну подлогу за извођење методе микродилуције код гљива.

Након овако припремљене микротитар плоче и инокулисања, финална концентрација квасаца била је 10^5 CFU/mL. Сви бунарчићи микротитар плоча су напуњени са 90 μ L бујона који је претходно инокулисан кандидом. Посебна микротитар плоча је употребљена за прављење дуплих разблажења етарских уља, одакле је потом преношено по 10 μ L одређене концентрације уља у бунарчиће претходно припремљене плоче. Етарска уља су растварана у ДМСО - у, а почетна концентрација зависила је од врсте тестиране биљке. Као позитивна контрола коришћен је антимикотик нистатин. Наредни корак био је

инкубација плоча у термостату на температури од 35 °C у трајању од 48 сати. Након периода култивације, читавање су минималне инхибиторне концентрације за сваки узорак старског уља понаособ. Микродилуциона метода је рађена у трипликату а добијене вредности су потом приказане табеларно.

4.4.2.2. Праћење анти-*Candida* активности одабраних уља током времена

Експерименти праћења анти-*Candida* активности током времена реализовани су да би се проценило време деловања старских уља (Behbahani et al., 2015; Bouyahya et al., 2019; Lv et al., 2011; Moreira Da Silva et al., 2018). Овај тест је имао за циљ да одреди време потребно за инхибицију раста при концентрацијама МИК и $\frac{1}{2}$ МИК или да идентификује тачно време потребно за смањење популације ћелија, као и тип дејства (фунгистатски или фунгицидни ефекат). Временске криве су генерисане коришћењем микротитар плоча које су садржале подлогу СДБ, са бунарчићима инокулисаним до коначне концентрације од 5×10^5 CFU/mL у присуству једног тест уља. Број преживелих ћелија је детектован на 595 nm коришћењем ELISA читача (Multiscan™ FC Microplate Reader, Thermo Scientific) у интервалима од 0, 2, 3, 4, 19, 20, 22, 24, 45, 46 и 48 сати инкубације на оптималној температури. Тестови су реализовани у три понављања.



Слика 13. ELISA читач (Multiscan™ FC Microplate Reader, Thermo Scientific)

4.4.3. Испитивање типа интеракције тест супстанци

4.4.3.1. Метода шаховске табле

Испитивање типа интеракције између тестираних супстанци спроведено је коришћењем методе шаховске табле (метод дилуције) (de Castro et al., 2015; Silva et al., 2011). Припремљена тест једињења су серијски разблажена два пута у Сабуро декстрозном бујону (СДБ) (HiMedia, Mumbai, India). Серијска двострука разблажења једног агенса рађена су у хоризонталним редовима, док су иста разблажења другог средства рађена у вертикалним редовима. Сви бунарчићи су затим инокулисани суспензијом квасца да би се постигла коначна концентрација од 5×10^5 CFU/mL. Плоче су затим инкубирани на 35 °C током 48 сати. Комбиновани ефекти тестираних једињења су израчунати и изражени као фракциони индекс инхибиторне концентрације (ФИКИ) (Wei et al., 2017). Израчунавање ФИКИ је реализовано коришћењем следећих једначина:

$$\text{ФИК}_a = \text{МИК}_{a-b} / \text{МИК}_a$$

$$\text{ФИК}_b = \text{МИК}_{b-a} / \text{МИК}_b$$

$$\text{ФИКИ} = \text{ФИК}_a + \text{ФИК}_b$$

где је ФИК_a била фракциона инхибиторна концентрација једињења 1, МИК_{a-b} је МИК једињења 1 у комбинацији са једињењем 2, МИК_a је била МИК само једињења 1, ФИК_b је била фракциона инхибиторна концентрација једињења 2, МИК_{b-a} је МИК једињења 2 у комбинацији са једињењем 1, а МИК_b је био МИК само једињења 2. ФИКИ је тумачен као синергистички ефекат када је $\leq 0,5$, као адитивни или индиферентан када је $> 0,5$ и ≤ 2 , и као антагонистички када је његова вредност > 2 .

4.4.4. Испитивање утицаја на факторе вируленције *Candida*

4.4.4.1. Кристал виолет метода (КВ)

Експерименти за процену утицаја етарских уља на способност формирања биофилма спроведени су у статичким условима на микротитар плочама са 96 бунарчића применом кристал виолет (КВ) методе (Stepanović et al., 2007; Stojanović-Radić et al., 2016). Након припреме суспензија, бунарчићи су напуњени МИК и $\frac{1}{2}$ МИК концентрацијама одабраних

тест етарских уља, припремљених у ДМСО растварачу. Сваки бунарчић је затим инокулисан суспензијом квасца припремљеном у RPMI-1640 подлози којем је додата 0,8% глюкоза, постижући коначну концентрацију ћелија од 5×10^5 CFU/mL. Тестирање је обављено у три понављања. После одговарајућег периода инкубације на 35 °C, садржај бунарчића је аспириран, испран два пута стерилним фосфатним пуфером (PBS, pH 7.4), осушен и обојен са 0,8% КВ током 20 минута. Микротитар плоче су затим испране стерилном дестилованом водом, а бунарчићи су напуњени са 250 μ L 96% (v/v) етанола. После 45 минута обезбојавања, добијени садржај је пребачен у стерилну микротитар плочу, а апсорбанца је измерена на 595 nm коришћењем ELISA читача (Multiscan™ FC Microplate Reader, Thermo Scientific).

4.4.4.2. Испитивање продукције/редукције герминационих цеви *C. albicans*

Тестирана су етарска уља како би се проценио потенцијални инхибиторни ефекат на продукцију герминационих цеви (*germ tube*) врсте *C. albicans*. Коришћена одговарајућа RPMI-1640 подлога у стерилним епруветама инокулисана је са одређеном запремином претходно припремљене суспензије квасаца да би се постигла коначна концентрација од 5×10^5 CFU/mL. Уља су додата у инокулисани припремљени бујон у два концентрацијама (МИК и $\frac{1}{2}$ МИК) и спроведен је инкубациони период (температурни режим на 35 °C) од 2 сата. Ћелије сваког узорка инкубиране у присуству или одсуству етарског уља су пребројане помоћу хеометра (Pinto et al., 2009; Silva et al., 2011), где је за сваки од њих одређиван укупан број ћелија (K_1) и број ћелија са продуктованим герминационим цевима (K_2). Сви експерименти су изведени у трипликату.

4.4.4.3. Испитивање способности продукције/редукције фосфолипазе

Тест продукције ензима фосфолипазе реализован је методом дифузије (*well-diffusion*) на агарној подлози са додатим жуманцетом (*egg yolk agar*) (Tsang et al., 2007). Агар је садржао 69,0 g/L СДА, 58,5 g/L NaCl и 20% (v/v) стерилног жуманцета (центрифугирано на 500 x g током 10 минута на 25 °C). Користећи стерилни помоћни лабораторијски прибор, у средини сваке агар плоче направљени су бунарчићи (пречника 9 mm) и напуњени са 100 μ L одговарајуће суспензије и етарског уља у концентрацијама МИК. Бунарчићи контролних Петри плоча су инокулисани само суспензијом кандиде, без третмана тест супстанцом. Све

инокулисане плоче су инкубиране на 35 °C, а зоне инхибиције су мерене након периода инкубације од 2 дана и 6 дана.

Вредности зона продукције/инхибиције (P_z) израчунате су коришћењем следеће једначине

$$P_z = P_k / P_{zp} + P_k$$

где P_z - вредност зоне продукције; P_k -пречник колоније; P_{zp} -пречник зоне непрозирности (преципитације). P_z је тумачен као продукција фосфолипазе када је $P_z < 1,00$; и као не-производња ензима када је P_z био 1.

4.4.5. Статистичка анализа

Резултати експеримената су изражени као средња вредност $\pm$ стандардна девијација, а статистички значајне разлике су одређене једнофакторском или двофакторском анализом варијансе (ANOVA) праћеном *Tukey's post-hoc* тестом за вишеструко поређење (*Graphpad Prism version 6*). Вредности вероватноће (p) мање од 0,05 сматране су статистички значајним.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У наставку рада биће приказани подаци анализе хемијског састава одабраних етарских уља породица Lamiaceae, Asteraceae и Rutaceae, добијени применом GC/MS метода. Анализа састава уља представља значајан део истраживања због доприноса свеобухватности студије и добијања релевантне слике о утицају хемијског састава на анти-*Candida* активност, као и због поређења са доступним подацима у литератури о хемијским профилима тестираних узорака. Резултати хемијске анализе састава етарских уља приказани су табеларно (табела 9, 12 и 17). Током овог истраживања пратили смо потенцијалну инхибиторну активност одабраних етарских уља биљака припадника породица Asteraceae, Lamiaceae и Rutaceae, на хумане клиничке изолате рода *Candida* (табела 10, 13 и 18). Методом праћења раста планктонских ћелија кандиди (*time-kill*) установљено је у ком тренутку, у периоду од 48 сати, су тестирана уља показала фунгистатски или/и фунгицидни ефекат. Моменат редукције раста ћелија може зависити од испитиване биљне врсте, као и испитиваног клиничког изолати (табела 14; слика 14, 15, 16 и слика 18, 22 и 23). У нашој студији испитивали смо типове интеракција између етарских уља међусобно, као и у комбинацији са антимикотиком, нистатином (табела 11, 15, 19 и 20).

Биофилмови представљају морфолошки облик многих микроорганизама који је знатно отпорнији на антимикробне агенсе од својих планктонских форми. Стога, сваки агенс који може да инхибира раст организма у његовом планктонском облику требало би да се тестира на биофилмове истог организма. У току реализације истраживања било је обухваћено и испитивање способности одабраних етарских уља да инхибирају формирање биофилм форми *Candida* ћелија. Етарска уља су тестирана у два концентрацијама, МИК и ½ МИК, на различите хумане изолате као и референтни сој *C. albicans* ATCC 24433. Резултати су статистички обрађени и приказани графиконима (слика 17, 19 и 24). Испитиван је утицај најактивнијих уља на остале факторе вируленције *Candida*. Ова студија представља скрининг одабраних секундарних метаболита биљака у циљу проналаска природног производа који би могао допринети новим алтернативним путевима лечења кандидоза.

5.1. Хемијски састав, анти-*Candida* и антивирулентна активност етарских уља одабраних биљних врста породице Lamiaceae

5.1.1. Хемијски састав етарских уља биљних врста *O. vulgare*, *T. vulgaris* и *S. montana*

Два етарска уља одабрана за ову студију из породице Lamiaceae била су комерцијално доступна (*O. vulgare*, *T. vulgaris*), а треће је добијено хидродестилацијом биљног материјала сушеног на ваздуху (*S. montana*). Њихов састав је детаљно проучаван комбинацијом GC и GC/MS, а идентификованих, укупно, 118 састојака наведено је у табели 9 заједно са њиховим релативним садржајем и ретенционим индексима. Идентификовани састојци представљени су 93,0-98,4% од укупно детектованих GC-пикова. Сва три профила етарских уља су били типични за биљну врсту, односно директно су одговарали претходно објављеним резултатима: *Origanum vulgare* (Baj et al., 2020; Teixeira et al., 2013), *Thymus vulgaris* (Porte & Godoy, 2008; Wesołowska & Jadczyk, 2019) и *Satureja montana* (Caprioli et al., 2019; Maccelli et al., 2019).

Табела 9. Хемијски састав етарских уља одабраних врста породице Lamiaceae

RI ^a	Састојак	Садржај (%) ^b			Метода идентификације ^b
		<i>O. vulgare</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>S. montana</i>	
785	Метил-2-метилбутират	тр. ^c	0,4	н.д. ^d	RI, MS, CoI
801	Хексанал	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
828	Фурфурал	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
846	(E)-2-Хексенал	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
858	(E)-3-Хексенол	тр.	0,1	н.д.	RI, MS, CoI
885	3-Хептанон	тр.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
927	α -Тујен	1,8	1,9	0,1	RI, MS
937	α -Пинен	1,1	1,0	0,3	RI, MS, CoI
938	Камфен	0,7	1,2	0,4	RI, MS, CoI
969	Бензалдеhid	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
972	1-Октен-3-ол	0,8	0,6	1,2	RI, MS, CoI
983	3-Октанон	0,2	тр	н.д.	RI, MS, CoI
984	β -Пинен	0,3	0,5	0,1	RI, MS, CoI
988	Мицен	1,6	1,9	0,7	RI, MS, CoI
996	3-Октанол	тр.	0,1	0,1	RI, MS, CoI
1003	(Z)-3-Хексен-1-ил-ацетат	н.д.	тр.	тр.	RI, MS, CoI
1010	α -Феландрен	н.д.	0,2	тр.	RI, MS
1014	Δ^3 -Карен	0,1	0,1	н.д.	RI, MS
1020	α -Терпинен	0,5	2,0	0,8	RI, MS, CoI
1028	p-Цимен	16,1	18,0	12,2	RI, MS, CoI
1032	Лимонен	0,6	0,6	1,1	RI, MS, CoI

1035	β -Феландрен	0,3	н.д.	н.д.	RI, MS
1036	1,8-Синеол	тр.	2,5	1,0	RI, MS, CoI
1045	(E)- β -Оцимен	0,2	н.д.	0,1	RI, MS
1060	γ -Терпинен	4,3	10,4	3,1	RI, MS
1072	cis-Линалоол-оксид (фураноидни)	н.д.	н.д.	0,2	RI, MS, CoI
1073	cis-Сабинен-хидрат	0,7	0,1	н.д.	RI, MS
1079	1-Нонен-3-ол	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1088	trans-Линалоол-оксид (фураноидни)	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1089	Терпинолен	0,1	0,2	0,3	RI, MS
1094	p-Цименен	тр.	н.д.	0,1	RI, MS
1095	(Z)-3-Хексен-ил-пропаноат	н.д.	0,1	н.д.	RI, MS
1100	Линалоол	0,7	н.д.	2,0	RI, MS, CoI
1104	1-Октен-3-ил-ацетат	н.д.	н.д.	0,3	RI, MS, CoI
1105	trans-Сабинен-хидрат	0,5	0,1	н.д.	RI, MS
1109	Пренил-изовалерат (3-метилбут-3-ен-1-ил-3-метилбутаноат)	н.д.	тр.	н.д.	RI, MS
1111	α -Тујон	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS, CoI
1122	β -Тујон	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1125	trans-p-Мента-2,8-диен-1-ол	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1128	cis-p-Мента-2-ен-1-ол	тр.	тр.	0,2	RI, MS
1146	trans-p-Мента-2-ен-1-ол	тр.	тр.	тр.	RI, MS
1146	trans-Пинокарвеол	н.д.	н.д.	0,3	RI, MS
1152	Камфор	н.д.	0,9	1,3	RI, MS, CoI
1159	Ментон	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1168	Пинокарвон	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1175	Борнеол	1,8	тр.	6,0	RI, MS, CoI
1185	Терпинен-4-ол	0,9	тр.	3,1	RI, MS, CoI
1187	p-Цимен-8-ол	0,2	тр.	0,7	RI, MS
1199	α -Терпинеол	н.д.	1,9	0,8	RI, MS, CoI
1202	cis-Дихидрокарвон	н.д.	0,5	0,3	RI, MS
1215	trans-Пиперитол	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1216	Вербенон	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1225	trans-Карвеол	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS
1229	Цитронелол	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1231	O-Метилтимол	0,1	2,8	0,5	RI, MS, CoI
1233	Изоборнил-формијат	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1242	O-Метилкарвакрол	2,7	1,3	8,2	RI, MS, CoI
1244	Пулегон	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1248	Кумин-алдехид	н.д.	н.д.	0,3	RI, MS
1249	Карвон	н.д.	н.д.	0,3	RI, MS, CoI
1254	Гераниол	н.д.	н.д.	0,8	RI, MS, CoI
1266	trans-Аскаридол-гликол	тр.	н.д.	тр.	RI, MS
1274	Гераниал	н.д.	тр.	тр.	RI, MS
1285	Изотимол	0,3	тр.	тр.	RI, MS
1287	Борнил-ацетат	н.д.	тр.	тр.	RI, MS, CoI
1295	Тимол	32,7	34,2	15,5	RI, MS, CoI

1306	Карвакрол	22,3	2,7	24,3	RI, MS, CoI
1347	Тимил-ацетат	тр.	0,1	тр.	RI, MS, CoI
1349	α -Терпинил-ацетат	н.д.	тр.	тр.	RI, MS
1352	α -Кубебен	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1358	Нерил-ацетат	тр.	тр.	0,1	RI, MS, CoI
1367	Карвакрил-ацетат	0,1	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1378	Борнил-пропаноат	н.д.	0,1	н.д.	RI, MS, CoI
1378	Геранил-ацетат	н.д.	н.д.	1,2	RI, MS, CoI
1381	α -Копаен	н.д.	тр.	0,2	RI, MS
1384	β -Кубебен	тр.	н.д.	н.д.	RI, MS
1390	β -Бурбонен	0,2	0,1	0,4	RI, MS
1393	β -Елемен	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1414	α -Гурјунен	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1427	(E)-Кариофилен	0,9	3,3	2,6	RI, MS, CoI
1436	β -Копаен	тр.	0,1	0,1	RI, MS
1446	Аромадендрен	н.д.	н.д.	0,4	RI, MS
1453	(E)- β -Фарнезен	н.д.	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1462	α -Хумулен	0,2	0,1	0,1	RI, MS, CoI
1468	Линалил-изовалерат	н.д.	0,2	н.д.	RI, MS, CoI
1468	<i>allo</i> -Аромадендрен	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1480	γ -Муролен	0,1	0,2	0,4	RI, MS
1488	Гермакрен D	н.д.	н.д.	0,5	RI, MS, CoI
1496	β -Селинен	тр.	н.д.	тр.	RI, MS
1498	γ -Аморфен	н.д.	0,2	н.д.	RI, MS
1498	Виридифлорен	н.д.	н.д.	0,4	RI, MS
1504	α -Муролен	н.д.	тр.	н.д.	RI, MS
1505	(E,E)- α -Фарнезен	0,3	н.д.	н.д.	RI, MS
1511	β -Бисаболен	1,0	0,1	0,9	RI, MS
1519	γ -Кадинен	0,1	0,2	0,3	RI, MS
1524	δ -Кадинен	0,2	0,4	0,5	RI, MS
1528	<i>trans</i> -Каламенен	н.д.	тр.	н.д.	RI, MS
1527	<i>cis</i> -Каламенен	тр.	н.д.	тр.	RI, MS
1543	α -Кадинен	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1544	(E)- α -Бисаболен	тр.	н.д.	н.д.	RI, MS
1548	α -Калакорен	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1553	Елемол	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1585	Спатуленол	0,4	н.д.	1,0	RI, MS, CoI
1591	Кариофилен-оксид	3,0	1,4	1,8	RI, MS, CoI
1599	4(14)-Салвиален-1-он	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1611	β -Оплопенон	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1618	Хумулен-эпоксид II	0,3	н.д.	тр.	RI, MS
1623	Ториленол	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1631	10- <i>epi</i> - γ -Еудезмол	н.д.	0,1	н.д.	RI, MS
1636	1- <i>epi</i> -Кубенол	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1645	(3Z)-Кариофила-3,8(13)-диен-5 β -ол	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS
1649	τ -Кадинол	н.д.	0,1	тр.	RI, MS
1651	<i>epi</i> - α -Муролол (<i>syn.</i> τ -муролол)	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS

1663	α -Кадинол	н.д.	н.д.	0,3	RI, MS
1678	14-Хидрокси-9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)- кариофилен	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS
1681	Кадален	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1698	Аморфа-4,9-диен-2-ол	тр.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
Укупно:		98,4	93,0	98,3	

^aЕкспериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони у односу на серију C₇-C₄₀ *n*-алкана. ^bСредње вредности три анализе. ^cRI – идентитет једињења потврђен поређењем ретенционих индекса; MS – идентитет једињења потврђен поређењем масених спектра; CoI – идентитет једињења потврђен експериментом ко-инјекције са стандардом. ^dтр, количине у траговима (< 0,05%).

^eн.д. – једињење није детектовано, *sup.* – синоним.

У сва три уља главни састојци били су оксигеновани монотерпени, тимол и карвакрол и угљоводоник *p*-цимен. Teixeira et al. (2013) истраживали су хемијски састав уља оригана, при чему су идентификовани карвакрол (14,5%), тимол (12,6%) и β -фенил-алкохол (12,8%) као главна једињења. Према GC/MS анализи коју су спровели Baj et al. (2020) етарско уље оригана имало је највећу концентрацију карвакрола (57,3%), затим 1,8-синеола (12,9%) и α -пинена (7,9%). Етарско уље тимијана садржало је значајну количину тимола (75,2%), заједно са нижим уделом карвакрола (7,7%) и *p*-цимена (6,3%). У узорцима овде анализираним, приметили смо сличан хемијски профил уља оригана, са тимолом (32,7%) као најзаступљенијим једињењем, праћеним карвакролом (22,3%) и *p*-цименом (16,1%). Слично, за уље тимијана, главни састојци били су тимол (34,2%), *p*-цимен (18,0%) и γ -терпинен (10,4%). Уље тимијана пореклом из Рио де Жанеира, Бразил, карактерише висока концентрација тимола (44,7%), *p*-цимена (18,6%) и γ -терпинена (16,5%) (Porte & Godoy, 2008). Током 2016. и 2017. истраживачи Wesołowska & Jadczak (2019) анализирали су хемијски састав етарских уља два култивара *T. vulgaris*, „English Winter“ и „Summer Thyme de Provence“. За „English Winter“ главни састојци били су тимол (45,0% у 2016. и 38,1% у 2017. години), *p*-цимен (7,6% и 10,3%), γ -терпинен (7,1% и 6,7%) и карвакрол (5,1% и 8,3%). Слично томе, култивар „Summer Thyme de Provence“ био је богат тимолом (36,8% у 2016. и 37,3% у 2017), *p*-цименом (15,7% и 11,2%), γ -терпиненом (5,3% и 11,1%) и карвакролом (6,5% и 5,4%).

Претходна студија Caprioli et al. (2019) истакла је разлику у саставу етарског уља између две подврсте „Winter savory“ из Италије: *S. montana* subsp. *variegata* и *S. montana* subsp. *montana*. Главни испарљиви састојци подврсте *variegata* били су карвакрол (22,5%), *p*-цимен (17,6%), тимол (17,4%), γ -терпинен (9,1%) и карвакрол-метил етар (7,1%).

Насупрот томе, типска подврста *montana* имала је веће концентрације карвакрола (61,9%), при чему су *p*-цимен (9,9%) и γ -терпинен (8,2%) такође присутни у значајним количинама (Caprioli et al., 2019). Наша анализа хидродестилованог етарског уља *S. montana* показала је да су доминантна једињења била карвакрол (24,3%), тимол (15,5%) и *p*-цимен (12,2%). У истраживању које су спровели Maccelli et al. (2019), GC/MS анализа четири различита узорка етарских уља *S. montana* открила је да су најзаступљенија једињења била карвакрол (23,9%–29%), његов изомер тимол (14,5%–16,5%), линалоол (16,0%–16,4%), γ -терпинен (12,3%–15,0%), *p*-цимен (9,4%–12,3%) и 1,8-синеол (6,2%–6,8%). За ово истраживање одабрана су три етарска уља са сличним садржајем монотерпенских фенола у различитим односима (тимол и карвакрол), које се верује да су носиоци антифунгалне активности, како би се испитала корелација између активности и садржаја ових једињења.

5.1.2. Испитивање анти-*Candida* активности одабраних етарских уља

Испитана етарска уља из породице *Lamiaceae* показала су значајне до умерене ефекте на клиничке изолате који припадају роду *Candida*. Детаљни резултати представљени у табели 10, показали су да сва испитивана етарска уља ефикасно инхибирају клиничке изолате *C. albicans* и *C. krusei*, са минималним инхибиторним концентрацијама (МИК) у распону од 0,312 до 2,500 mg/mL. Ове вредности су варирале у зависности од врсте квасца и специфичне биљне врсте. Посебно треба истаћи да је уље оригана показало антифунгалну активност у распону од 0,312 до 0,625 mg/mL, док се ефикасност уља ртањског чаја кретала од 0,312 до 1,250 mg/mL. Уље тимијана, с друге стране, показало је инхибиторне ефекте у опсегу од 0,312 до 2,500 mg/mL. Ови подаци наглашавају значајан инхибиторни потенцијал свих тестираних уља против планктонског облика кандидозних сојева.

Упоређујући резултате наше студије са онима који су претходно наведени у литератури, етарска уља *T. vulgaris* и *O. vulgare* показују изванредан инхибиторни ефекат против сојева *Candida* (Ahmad et al., 2014; Baj et al., 2020; Cid-Chevecich et al., 2022; de Andrade et al., 2023; Gucwa et al., 2018; Karpiński et al., 2023; Proškovcová et al., 2021). У студији коју су спровели Ahmad et al. (2014) приказан је изузетно снажан инхибиторни ефекат етарског уља тимијана на референтне сојеве *C. albicans* ATCC 10231 и *Candida tropicalis* ATCC 201380, са концентрацијом МИК од само 0,062 mg/mL. Њихов узорак уља је идентификован као тимол хемотип обзиром да су главни састојци били тимол са 60,2% и

p-цимен са 15,4% заступљености. Боља активност уља у наведеном истраживању у односу на наше може се приписати дупло већем садржају тимола, које је познато антимиembroно једињење (de Castro et al., 2015; Micucci et al., 2020).

Табела 10. Минималне инхибиторне концентрације етарских уља одабраних одабраних биљних врста породице Lamiaceae

Бр.	Изолати	<i>S. montana</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>T. vulgaris</i>	Нистатин
		МИК (mg/mL)	МИК (mg/mL)	МИК (mg/mL)	МИК (mg/mL)
1	<i>Candida albicans</i>	1,250	0,312	2,500	0,009
2	<i>Candida albicans</i>	1,250	0,312	2,500	0,004
3	<i>Candida krusei</i>	1,250	0,625	1,250	0,009
4	<i>Candida albicans</i>	1,250	0,625	2,500	0,004
5	<i>Candida albicans</i>	1,250	0,312	2,500	0,019
6	<i>Candida albicans</i>	0,625	0,312	1,250	0,004
7	<i>Candida krusei</i>	0,312	0,625	0,312	0,004
8	<i>Candida albicans</i>	0,625	0,312	1,250	0,009
9	<i>Candida albicans</i>	0,312	0,312	0,312	0,004
10	<i>Candida krusei</i>	0,625	0,312	0,312	0,002
11	<i>Candida albicans</i>	1,250	0,312	2,500	0,004

МИК – Минимална инхибиторна концентрација; Анти-*Candida* активност=значајна (МИК<2 mg/mL); средња (МИК 2–4 mg/mL); слаба (МИК>4 mg/mL) (Ahmad et al., 2014)

Према студији Gucwa et al. (2018), *T. vulgaris* уље је показало јаку анти-*Candida* активност, са највишом вредности МИК забележеном на 5,73 mg/mL, а доминантном концентрацијом од 0,73 mg/mL. Вај et al. (2020) спровели су истраживање које је укључивало етарска уља оригана, ртањског чаја и тимијана, што је упоредиво са нашим подацима. Налази поменуте студије показали су активност у распону од 0,25-0,50 mg/mL према референтним сојевима *C. albicans* и *C. glabrata*, као и према изолатима одговорним за оралне инфекције људи. Ово се може објаснити сличношћу у хемијском профилу уља о којој је већ било речи у одељку анализе хемијског састава уља 5.1.1. Proškovcová et al. (2021)

утврдили су значајну анти-*Candida* активност за етарска уља *O. vulgare* и *T. vulgaris* са МИК вредношћу од 0,4 mg/mL. Доминантни састојци уља тимијана били су *p*-цимен (40,0%) и тимол (32,0%), док је узорак оригана имао висок садржај карвакрола (85,0%). У студији коју су спровели Karpiński et al. (2023), представљени су подаци о активности оригана и тимијана, при чему су оба уља показала вредности МИК испод 6,25 mg/mL. Фитохемијски састав уља је дат на основу података добијених од произвођача (Етја, Елблаг, Пољска). Карвакрол (>50,0%) је идентификован као главно једињење уља оригана, док су *p*-цимен (30,0–40,0%) и тимол (<30,0%) били доминантни састојци уља тимијана. Хемијски профил наших узорака етарских уља био је у складу са налазима претходно поменуте студије у смислу доминантних састојака. Међутим, резултати наше студије су показали већу активност ових супстанци против изолата *Candida*, са вредностима МИК испод 2,5 mg/mL, вероватно у смислу већег садржаја тимола. У својој студији, Cid-Chevecich et al. (2022) потврдили су значајан инхибиторни ефекат уља оригана на референтне сојеве. У поменутом истраживању вредности МИК приказане су у форми МИК₅₀ што је концентрација при којој је раст тестираних сојева инхибиран за 50,0%. Конкретно, МИК за *C. albicans* ATCC 90029 био је 0,01 µg/mL, док је за *C. albicans* ATCC 10231 био 0,97 µg/mL. У случају сојева кандида који нису *albicans* (*non-albicans*), вредности МИК биле су 2,6 µg/mL за *C. dubliniensis* ATCC CD36 и 5,3 µg/mL за *C. krusei* ATCC 6258. У студији de Andrade et al. (2023), представљени су подаци о одличној инхибиторној активности етарског уља оригана на раст врсте *C. albicans* ATCC 90028, са концентрацијом МИК од 12,5 µL/mL.

Упоредивањем добијених резултата са претходно документованим у научној литератури, постаје евидентно да су етарска уља и/или екстракти врсте *Satureja montana* показали значајан инхибиторни ефекат на сојеве *Candida* (Aćimović et al., 2022; Kremer et al., 2015; Nikolić et al., 2014). У свом раду Nikolić et al. (2014) су приказали антибактеријско и антифунгално дејство различитих уља (*Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Lavandula angustifolia*, *S. montana* и *Salvia lavandulifolia*) из породице Lamiaceae. Они су идентификовали уље *S. montana* као снажно средство против кандидоза, са МИК вредностима у распону од 0,9 до 1,0 µg/mL док је активност нашег узорка била у распону од 312 до 1250 µg/mL. Хемијска анализа уља *S. montana* идентификовала је тимол као доминантан састојак (44,6%), затим *p*-цимен (13,4%) и карвакрол (6,2%). Овај хемијски профил био је сличан узорку нашег уља у смислу главних састојака док је процентуална

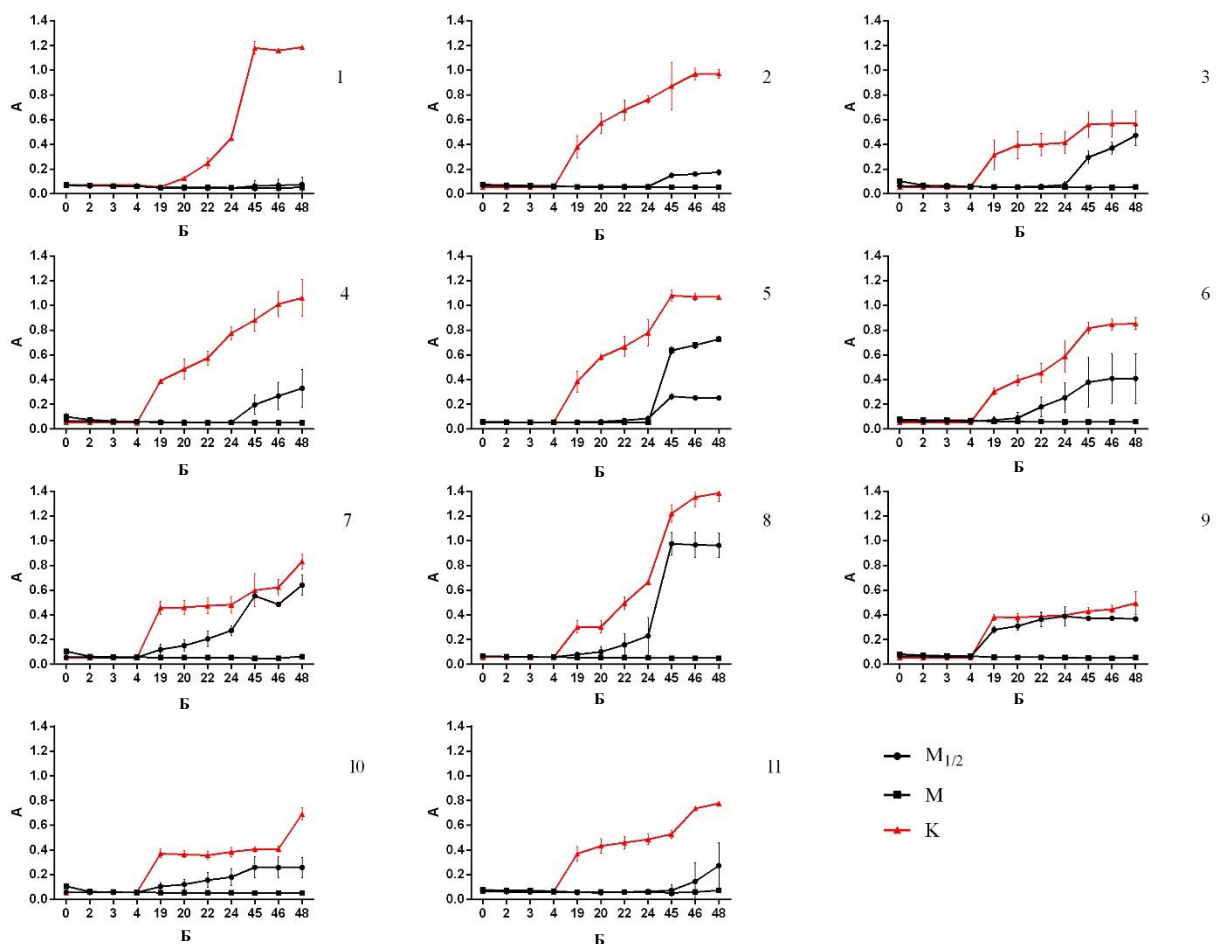
заступљеност једињења била знатно различита, карвакрол (24,3%), тимол (15,5%) и *p*-цимен (12,2). Већи садржај тимола је вероватно допринео бољој антифунгалној активности уља *S. montana* испитиваног у њиховом раду. Kremer et al. (2015) су испитивали екстракте изоловане из *S. montana* и *S. subspicata* Vis., откривајући њихову значајну ефикасност. Инхибиторне концентрације етанолних и метанолних екстраката врсте *S. montana*, против референтног соја *C. albicans* ATCC 10231, биле су у распону од 15,3 до 63,30 µg/mL. Активност је зависила од подручја на ком је сакупљан материјал као и садржаја хемијских једињења испитиваног биљног материјала. Aćimović et al. (2022) су спровели експерименте који су укључивали врсту *S. montana*, користећи различите методе екстракције за изоловање метаболита. Њихови подаци су потврдили снажан инхибиторни ефекат етарског уља против референтног соја *C. albicans* ATCC 10231. Студија је укључивала 12 различитих етарских уља тестираних против вагиналних изолата врсте *C. albicans*, примећено је да је етарско уље ртањског чаја показало изузетну ефикасност против свих тестираних клиничких изолата кандиди. У постојећој литератури, постоје ограничене информације о ефикасности етарског уља изолованог из врсте *S. montana* на клиничке изолате и референтне сојеве рода *Candida*. Сходно томе, наша студија је веома значајна јер доприноси драгоценим подацима о анти-*Candida* ефектима овог уља, при чему је МИК вредност била испод 1,25 mg/mL.

5.1.3. Праћење анти-*Candida* активности етарских уља током времена

Реализовани експерименти обухватили су процену инхибиторне активности етарских уља *T. vulgaris*, *O. vulgare* и *S. montana* на изолате кандиди и референтног соја *C. albicans* ATCC 24433, тестирајући МИК и ½ МИК вредности током времена. Прикупљени подаци су затим подвргнути статистичкој анализи и графички приказани (Слика 14, 15 и 16). Занимљиво је да је концентрација МИК свих тестираних уља показала снажну инхибиторну активност током 48-часовног трајања. Код неколико изолата, и МИК и ½ МИК вредности антифунгалних агенаса резултирале су потпуном инхибицијом раста планктонских облика ћелија кандиди. Резултати истраживања показали су да је почетак раста контролне популације планктонских ћелија квасаца био примећен након 4 сата од почетка инкубационог периода.

При концентрацији МИК уља оригана утврђена је висока ефикасност (фунгицидни ефекат) код 81,0% од укупног броја тестираних изолата, што представља значајан резултат

истраживања (слика 14). Након 45 сати инкубационог периода, код изолата 5 и 11 примећен је опоравак ћелија и раст, при чему је редукција ћелија износила 41,2% и 90,6%, тим редоследом. Уље је такође било ефикасно при $\frac{1}{2}$ МИК, значајно инхибирајући раст ћелија сојева 1, 2, 3, 4, 5 и 11 током првих 24 сата (100%). Најосетљивији изолат на третман обема концентрацијама уља органа био је изолат 1 где је редукција раста након 48 сати, при МИК дози износила 100% а при $\frac{1}{2}$ МИК 93,9%.



Слика 14. Праћење анти-*Candida* активности етарског уља врсте *O. vulgare* током времена. Статистичка анализа – двофакторска ANOVA са *Tukey post hoc* тестом, $p < 0,05$.

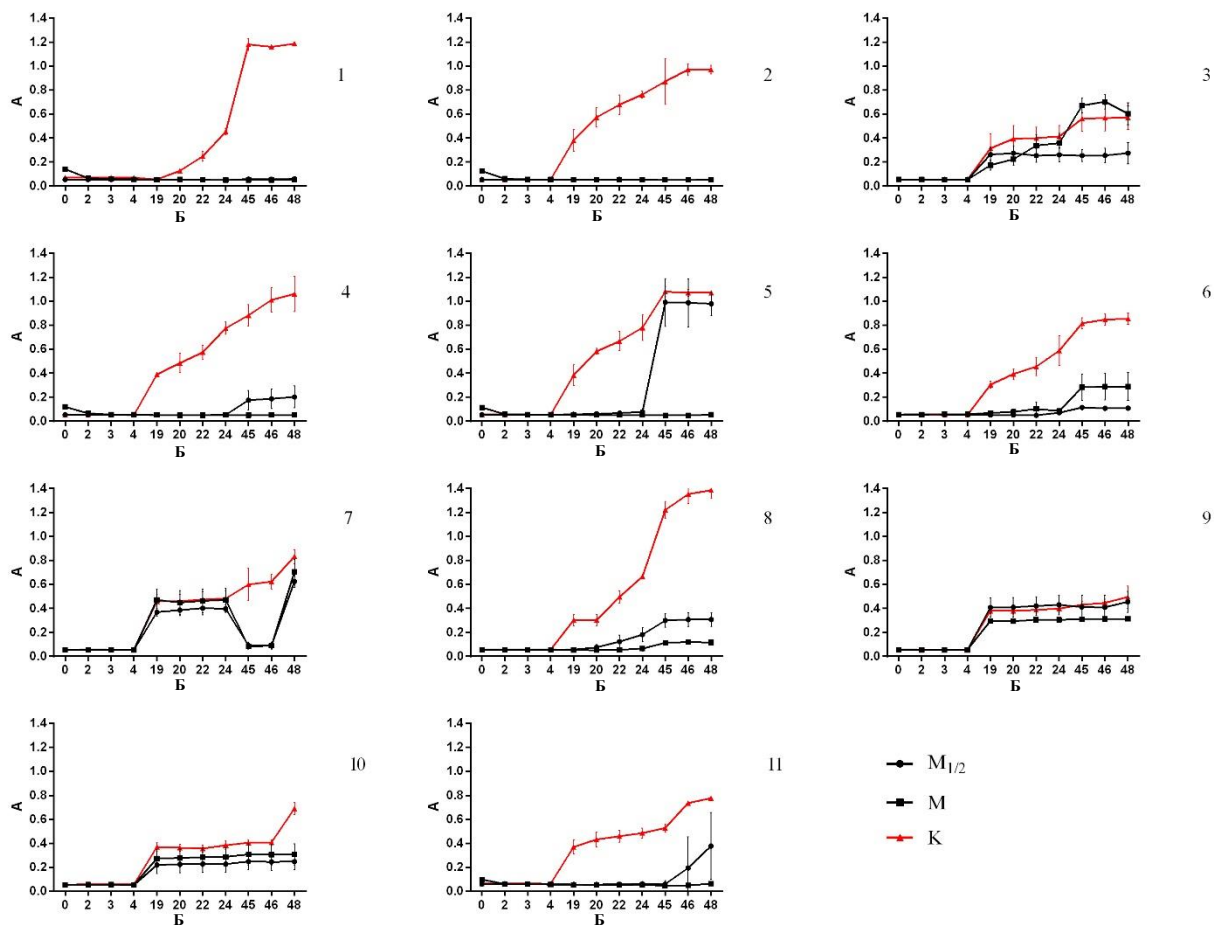
$M_{1/2}$ – $\frac{1}{2}$ МИК; М – МИК; К – контрола; А – апсорбанца; Б – временски период.

Подаци из литературе утврдили су јаку анти-*Candida* активност етарских уља добијених из биљака породице Lamiaceae, показујући ефикасност у различитим временским периодима и у различитим концентрацијама (Alshaikh & Perveen, 2021; Gucwa et al., 2018;

Karaman et al., 2017). Gucwa et al. (2018) тестирали су неколико одабраних етарских уља (*T. vulgaris*, *C. limonum*, *P. graveolens*, *C. cassia*, *O. basilicum*, и *E. caryophyllus*) на референтни сој *C. albicans* ATCC 10231, и потврђен је фунгистатски ефекат оригана употребом методе испитивања времена редукције броја ћелија (*time-kill assay*). Значајно смањење броја ћелија примећено је 6 и 14 сати након третмана при концентрацијама МИК. Студија коју су спровели Karaman et al. (2017) испитивала је стопу раста клиничких сојева рода *Candida* изолованих од жена са потврђеним вагиналним инфекцијама. Они су третирали изолате различитим концентрацијама етарског уља *O. vulgare* и приметили значајну инхибицију раста кандиди, која се повећавала како се концентрација уља повећавала. Наши подаци су у складу са поменутом студијом, јер смо такође приметили значајну активност уља оригана код већине тестираних сојева током 48-часовног периода праћења (слика 14).

У случају уља тимијана, тестирани агенс је потпуно инхибирао раст (фунгицидни ефекат) на концентрацији МИК код 45,5% од укупног броја тестираних изолата (слика 15). Након 4 сата инкубационог периода, код изолата 3, 9 и 10 примећен је опоравак ћелија и раст, при чему је редукција износила 44,6%, 22,4% и 26,2%, тим редоследом. Може се издвојити изолат 7 где је примећен опоравак ћелија након 4 сата при чему готово да није било редукције али је затим након 24 сата од почетка третмана примећено значајно смањење броја ћелија што може указати на специфичност клиничког изолата. Уље је такође било ефикасно при $\frac{1}{2}$ МИК, значајно инхибирајући раст ћелија сојева 4, 5, 6, 8 и 11 током првих 24 сата. Најосетљивији изолати на третман обема концентрацијама уља тимијана били су изолати 1 и 2 где је редукциона способност након 48 сати износила 100%.

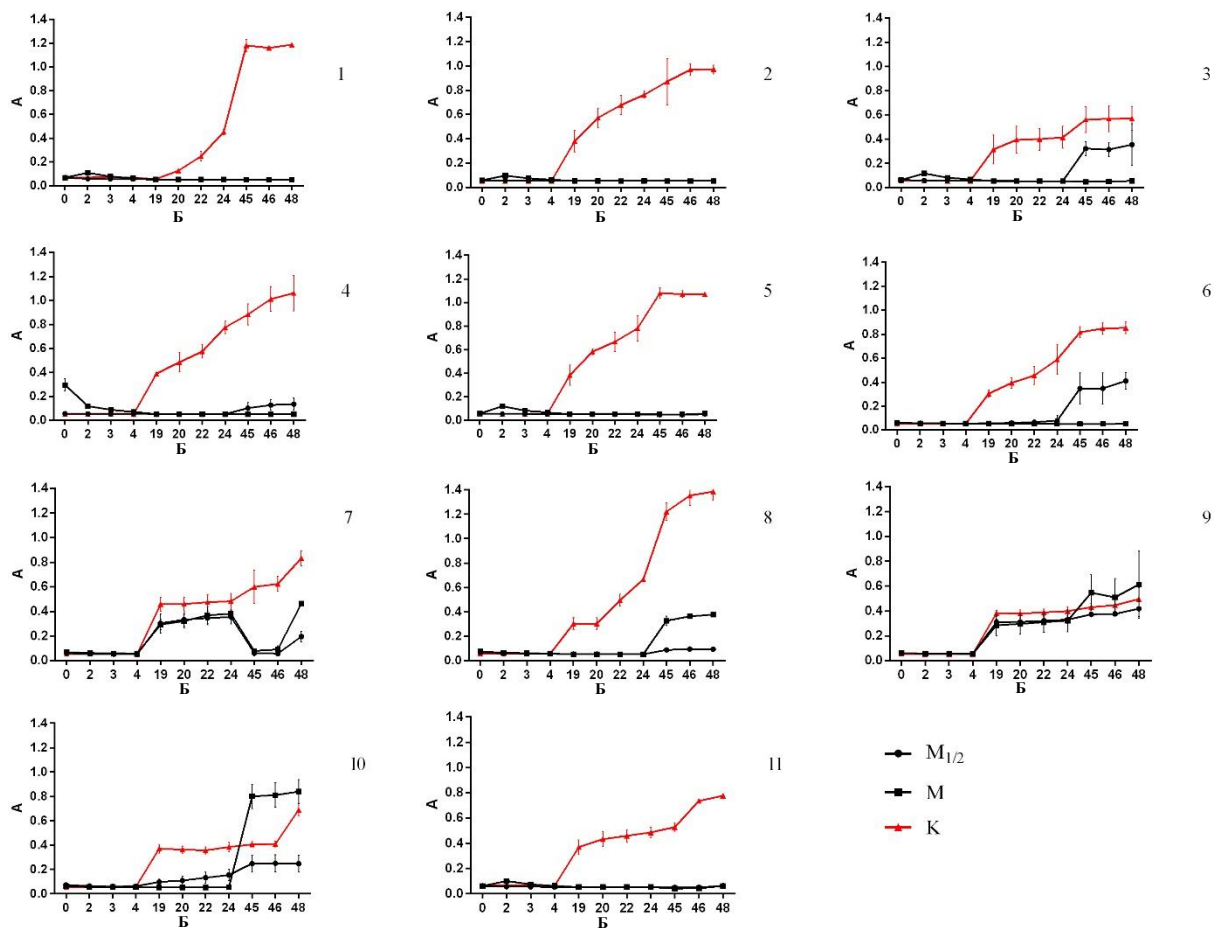
Alshaikh & Perveen (2021) истраживали су фунгицидни потенцијал етарског уља *T. vulgaris* на сојеве *C. albicans* отпорне на флуконазол, користећи тест праћења редукције броја ћелија током времена. Резултати су открили значајно смањење броја ћелија код свих тестираних изолата након 12 сати инкубације, са потпуном инхибицијом раста постигнутом до 18. сата. Подаци добијени током нашег истраживања су у складу са претходним истраживањима о ефектима уља тимијана.



Слика 15. Праћење анти-*Candida* активности етарског уља врсте *T. vulgaris* током времена. Статистичка анализа – двофакторска ANOVA са *Tukey post hoc* тестом, $p < 0,05$.

$M_{1/2}$ – $\frac{1}{2}$ МИК; М – МИК; К – контрола; А – апсорбанца; Б – временски период.

Етарско уље *S. montana*, при концентрацији МИК, показало је високу ефикасност (фунгицидни ефекат) код 54,5% од укупног броја тестираних изолата (слика 16). Након 24 сата инкубационог периода, код изолата 8 и 10 примећен је опоравак ћелија и раст, при чему је редукција ћелија износила 73,2% и 0,0%, тим редоследом. Уље је такође било ефикасно при $\frac{1}{2}$ МИК, значајно инхибирајући раст ћелија сојева 3, 4 и 6 током првих 24 сата (100%). Најосетљивији изолати на третман обема концентрацијама уља ртањског чаја били су 1, 2 и 5 где је редукциона способност након 48 сати износила 100%. На основу 48-часовног периода праћења и резултата микродилуционе методе, може се закључити да уље ртањског чаја има значајан антифунгални потенцијал.



Слика 16. Праћење анти-*Candida* активности етарског уља врсте *S. montana* током времена. Статистичка анализа – двофакторска ANOVA са *Tukey post hoc* тестом, $p < 0,05$.

$M_{1/2}$ – $\frac{1}{2}$ МИК; М – МИК; К – контрола; А – апсорбанца; Б – временски период.

5.1.4. Тип интеракције уља комбинованих са нистатином/другим уљима

У оквиру овог истраживања детаљно смо испитали све могуће интеракције између одабраних етарских уља међусобно као и у комбинацији са нистатином. Овај свеобухватан приступ обезбеђује детаљан преглед података о њиховом синергистичком потенцијалу (табела 11). Тест је спроведен коришћењем два одабрана клиничка изолата и једног референтног соја *C. albicans* ATCC 24433. Наши резултати су показали постојање значајног синергистичког ефекта у већини тестираних комбинација, при чему је најзначајнији утицај примећен у свим случајевима на референтни сој. Добијени подаци указују на значајан диспаритет у осетљивости између изолата. Конкретно, изолат *C. krusei* је показао значајно

већу осетљивост на све тестиране комбинације у поређењу са изолатом *C. albicans*. Можемо приметити да је само код комбинације уља ртањског чаја и органа (*S/O*) установљен адитивни ефекат, док су све остале комбинације третмана показале изузетан синергизам тестираних супстанци.

Табела 11. Синергистички потенцијал комбинованих етарских уља, као и њихове појединачне комбинације са нистатином, на клиничке изолате *Candida* spp. и референтног соја *C. albicans* ATCC 24433

Комбинације	<i>Candida albicans</i> ATCC 24433			<i>Candida krusei</i> 7			<i>Candida albicans</i> 9		
	МИК _п	МИК _к	ФИК	МИК _п	МИК _к	ФИК	МИК _п	МИК _к	ФИК
1 <u>T/O</u>									
<i>T. vulgaris</i>	1,250	0,078	0,062	0,312	0,039	0,125	0,312	0,156	0,50
<i>O. vulgare</i>	0,312	0,039	0,125	0,625	0,078	0,125	0,312	0,078	0,25
*ФИКИ			0,187			0,25			0,75
Интеракција			С			С			А
2 <u>T/NY</u>									
<i>T. vulgaris</i>	1,250	0,312	0,250	0,312	0,078	0,25	0,312	0,078	0,25
Нистатин	0,004	0,0005	0,125	0,004	0,0005	0,125	0,004	0,001	0,25
*ФИКИ			0,375			0,375			0,5
Интеракција			С			С			С
3 <u>O/NY</u>									
<i>O. vulgare</i>	0,312	0,039	0,125	0,625	0,078	0,125	0,312	0,156	0,50
Нистатин	0,004	0,001	0,250	0,004	0,0005	0,125	0,004	0,0005	0,125
*ФИКИ			0,375			0,25			0,625
Интеракција			С			С			А
4 <u>S/O</u>									
<i>S. montana</i>	0,625	0,156	0,25	0,312	0,156	0,500	0,312	0,156	0,50
<i>O. vulgare</i>	0,312	0,078	0,25	0,625	0,078	0,125	0,312	0,078	0,25
*ФИКИ			0,50			0,625			0,75
Интеракција			С			А			А
5 <u>S/T</u>									
<i>S. montana</i>	0,625	0,078	0,125	0,312	0,0195	0,062	0,312	0,156	0,50
<i>T. vulgaris</i>	1,250	0,156	0,125	0,312	0,0195	0,062	0,312	0,078	0,25

*ФИКИ Интеракција			0,25 C			0,125 C			0,75 A
6	<u>S/NY</u>								
<i>S. montana</i>	0,625	0,156	0,250	0,312	0,039	0,125	0,312	0,039	0,125
Нистатин	0,004	0,0002	0,062	0,004	0,0005	0,125	0,004	0,001	0,25
*ФИКИ Интеракција			0,31 C			0,25 C			0,375 C

МИК_л-минимална инхибиторна концентрација појединачно (mg/mL); МИК_к-минимална инхибиторна концентрација у комбинацији (mg/mL); ФИК-фракциона инхибиторна концентрација; ФИКИ-фракциони инхибиторни концентрациони индекс. *T/O* – *T. vulgaris/O. vulgare*; *T/NY* – *T. vulgaris*/Нистатин; *O/NY* – *O. vulgare*/Нистатин; *S/O* – *S. montana/O. vulgare*; *S/T* – *S. montana/T. vulgaris*; *S/NY* – *S. montana*/Нистатин. С – синергизам; А – адитивни ефекат; Ант. – антагонизам. *ФИКИ је тумачен као синергистички ефекат када је $\leq 0,5$, као адитивни или индиферентан када је $> 0,5$ и ≤ 2 , и као антагонистички када је његова вредност > 2 .

На основу претходно објављених истраживања, постоје подаци о синергистичком потенцијалу етарских уља из породице Lamiaceae, у зависности од специфичне комбинације агенса или сојева који су укључени (Blanc et al., 2023; de Castro et al., 2015; Ermenlieva et al., 2022; Rosato et al., 2008, 2009). Rosato et al. (2008) истраживали су интеракцију између уља *O. vulgare* и антимицотика, амфотерицина Б. Утврђене вредности за уље оригана су показале МИК А, МИК Б и ФИК опсеге од 0,35 до 0,7 mg/mL, 0,04 до 0,28 mg/mL, 0,03 до 0,4 mg/mL, тим редоследом. Слично, амфотерицин Б је показао МИК А, МИК Б и ФИК опсеге који обухватају 0,5 до 2,0 mg/mL, 0,02 до 0,8 mg/mL и 0,03 до 0,4 mg/mL. У следећој студији коју је спровела слична група истраживача на истом одељењу у Барију, Италија, наредне године, објављени су подаци о комбинацији уља оригана и нистатина (ФИК индекс се кретао између 0,11 и 0,17) (Rosato et al., 2009).

Blanc et al. (2023) спровели су истраживање ефикасности уља тимијана против два клиничка изолата *C. albicans* CCC193-13 и CCC121-16, како појединачно тако и у комбинацији са комерцијалним антимицотикима. Резултати су открили да уље испољава ограничену активност против оба соја (МИК/МФК=1000/1000 $\mu\text{g/mL}$) и показује адитивност када се комбинује са тестираним лековима. Само је комбинација уља тимијана и посаконазола показала делимичан синергизам (МИК=31,25/0,0039 $\mu\text{g/mL}$) у односу на оба соја. У поређењу са нашим истраживањем, добијени подаци су потврдили синергистичку интеракцију између уља тимијана и нистатина против соја *C. albicans* ATCC 24433 као и тестираних клиничких изолата. ФИК индекс ове комбинације кретао се од 0,375 до 0,5 што

указује на значајан и обећавајући синергистички потенцијал уља тимијана. У истраживању које су реализовали de Castro et al. (2015), тимол је комбинован са нистатином у циљу испитивања ефекта на сојеве одговорне за оралне инфекције кандидом (вредност ФИК индекса је била 0,25).

Ermenlieva et al. (2022) испитивали су интеракцију етарских уља тимијана и оригана са конвенционалним антифунгалним препаратима. У поменутој студији, истраживачи су утврдили синергистичку интеракцију између уља тимијана и оригана када се комбинују са антимикотичким леком нистатином против референтног соја *C. albicans* ATCC 10231. Вредности ФИК индекса биле су 0,22 за уље тимијана и 0,29 за уље оригана. Насупрот томе, наша студија пружа свеобухватнију анализу интеракција које укључују три уља која потичу из породице Lamiaceae, како међусобно тако и у комбинацији са нистатином. Такође, наше истраживање је утврдило синергистички ефекат између тимијана и уља оригана у односу на референтни сој *C. albicans* ATCC 24433. Овај ефекат је приметно постигнут при ниским МИК концентрацијама од 0,078 и 0,039 mg/mL, тим редоследом, док је ФИК индекс износио 0,187. Значајни ефекти су примећени и у интеракцији уља оригана са нистатином (O/NY) против *C. albicans* ATCC 24433 и клиничког изолат *C. krusei*, са вредностима ФИК индекса од 0,375 и 0,25, тим редоследом.

Занимљиво је да када се комбинује са нистатином, етарско уље екстраховано из врсте *S. montana* показало је синергистички ефекат против свих тестираних сојева кандида са вредностима ФИК индекса у распону од 0,25 до 0,375 у зависности од тестираног изолат. Уље ртањског чаја је испољило синергистичке и адитивне ефекте у комбинацији са уљима тимијана и оригана, а најзначајнији податак представља индекс од 0,125 у интеракцији са тимијаном у односу на клинички изолат *C. krusei*. Методом микродилуције је потврђена значајна инхибиторна активност испитиваних уља, док су методом шаховске табле показане високо значајне синергије у већини процењених интеракција. Колико нам је познато, у литератури нема доступних података о испитивању интеракције уља *S. montana* са другим антифунгалним агенсима на планктонске ћелије рода *Candida*. Важан податак нашег истраживања може бити и одсуство било каквих антагонистичких ефеката у тестираним комбинацијама, наглашавајући ефективност комбинованог приступа.

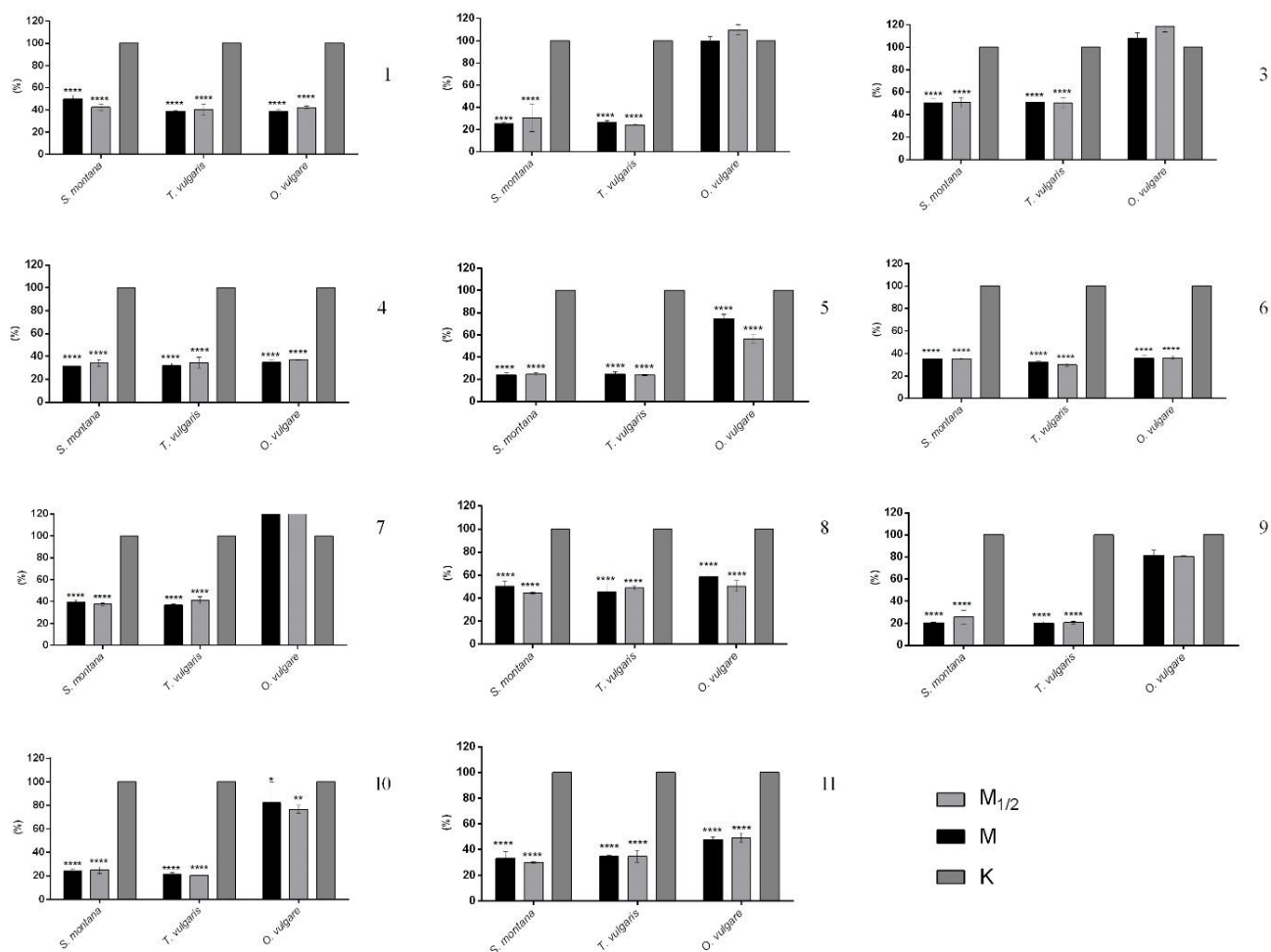
5.1.5. Антивирулентни ефекат

У нашој студији, истражили смо способност рода *Candida* да формира биофилмове и проценили проценат инхибиције формирања током третмана етарским уљима у инхибиторним и суб-инхибиторним концентрацијама. Овај део истраживања обухватао је процену утицаја три етарска уља на формирање биофилма током периода од 48 сати. Уља су одабрана на основу доступне литературе о њиховој активности описано у теоријском делу рада.

Кроз статистичку анализу применом двофакторског ANOVA теста са *Tukey post-hoc* компарацијом, приметили смо значајну способност етарских уља *O. vulgare*, *T. vulgaris* и *S. montana* да инхибирају стварање биофилма кандида у поређењу са не-третираном контролом (слика 17). Примећено је значајно смањење формирања биофилма након третмана етарским уљем *O. vulgare* у концентрацијама МИК и $\frac{1}{2}$ МИК код два клиничка изолата. Највеће смањење од 63,9% при $\frac{1}{2}$ МИК и 64,5% при МИК уочено је у случају изолата 6 што имплицира да је био најосетљивији на третман уљем оригана. Обе тестиране концентрације значајно су редуковале способност формирања биофилма и у случају изолата 4 при чему је редукција износила 65,1% при МИК а 62,9%, при $\frac{1}{2}$ МИК дози.

Значајна редукциона способност установљена је и за остала два уља (*T. vulgaris* и *S. montana*) при чему је њихов утицај на биофилм кандида био израженији. Установљен је висок степен редукције формирања након третмана уљем тимијана у концентрацијама МИК и $\frac{1}{2}$ МИК код 45,5% од укупног броја тестираних изолата (2, 5, 6, 9 и 10). Проценат смањења биофилм форми код претходно наведених сојева *Candida* кретао се од 67,7% до 79,9%. Обе тестиране концентрације значајно су редуковале способност формирања биофилма у случају изолата 9 при чему је редукција износила 79,9% при МИК а 79,4% при $\frac{1}{2}$ МИК дози. Етарско уље *S. montana* је испољило значајну инхибиторну активност ($p < 0,0001$) код свих испитиваних изолата. Највећа редукција од 75,5% при половини МИК и 76,18% на МИК утврђена је у случају изолата 5 што имплицира да је био најосетљивији на третман уљем ртањског чаја. Обе тестиране концентрације значајно су редуковале способност формирања биофилма и у случају изолата 10 при чему је редукција износила 75,9% при МИК а 75,0% при $\frac{1}{2}$ МИК дози. На основу података добијених нашим истраживањем, евидентно је да

етарска уља *S. montana* и *T. vulgaris* поседују изузетан инхибиторни потенцијал у смањењу способности кандиде да формира биофилм.



Слика 17. Антибиофилм активност етарских уља *O. vulgare*, *T. vulgaris* и *S. montana* на клиничке изолате *Candida*. Статистичка анализа - двофакторска ANOVA са Tukey post hoc тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ у односу на контролу. $M_{1/2}$ – $\frac{1}{2}$ МИК; М – МИК; К – контрола.

Ослањајући се на податке из литературе, може се рећи да постоји значајна анти-*Candida* активност етарских уља биљака из породице Lamiaceae у инхибицији формирања биофилма (Cid-Chevecich et al., 2022; Nacioglu et al., 2021; Karpiński et al., 2023; Proškovcová et al., 2021; Tomičić et al., 2022). У студији Proškovcová et al. (2021), оригано и тимијан су

показали сличну ефикасност у смањењу формирања биофилма ћелија *Candida*, са МИК вредностима од 0,3 mg/mL и 0,4 mg/mL, тим редоследом. У свом истраживању, Karpiński et al. (2023) открили су да уља оригана и тимијана показују веома значајан ефекат у смањењу формирања биофилма, постижући смањење од приближно 90,0% након третмана при концентрацијама МИК на сојевима кандида. Обе ове студије поткрепљују резултате наше студије, где је примећено значајно смањење формирања биофилма међу изолатима *Candida* након третмана уљима тимијана и оригана, које је ишло преко 50,0%. У својој студији, Čid-Chevesich et al. (2022) дали су податке о утицају уља оригана на биофилмове. Етарско уље је показало смањење виталности унутар формираних биофилма сојева *C. albicans* ATCC 90029 и ATCC 10231, са вредностима МИК₅₀ од 0,0074 mg/mL и 0,0028 mg/mL, тим редоследом. Подаци прикупљени у нашем истраживању су у складу са налазима студије Томићић et al. (2022), који је показао значајну активност уља оригана и тимијана у инхибицији формирања биофилма током почетне фазе. У свом експерименту, спроведеном коришћењем соја *C. albicans* ATCC 10231, приметили су смањење за више од 50,0% током фазе формирања биофилма. Истраживање које су спровели Насиоглу et al. (2021) фокусирао се на ефекат етарског уља оригана на зреле биофилме *Candida* spp. Њихови резултати су показали да није било статистички значајног смањења броја ћелија у биофилмовима. Наше истраживање је добило значајне податке који показују статистички значајно смањење током почетне фазе формирања биофилма кандиде. Ово указује на потенцијал уља да делује у раним фазама, што је и логичан резултат јер су зрели облици биофилма отпорнији на третман антифунгалним супстанцама.

Постојећа литература указује на значајну антифунгалну активност етарског уља *S. montana* (Aćimović et al., 2022; Kremer et al., 2015; Kundaković et al., 2014; Nikolić et al., 2014), али нисмо пронашли доступна истраживања о његовом утицају на способност сојева *Candida* да формирају биофилм. Међутим, постоје доступни подаци о активности других врсти *Satureja* или главних састојака (Miranda-Cadena et al., 2021; Sharifzadeh et al., 2016; Touil et al., 2020). Sharifzadeh et al. (2016) су демонстрирали антибиофилм активност етарског уља *Satureja hortensis* на изолате *C. albicans* из букалних лезија код ХИВ⁺ особа, постижући значајно смањење формирања биофилма у распону од 67,0% до 87,1%. Слично, наши резултати указали су на значајан ефекат на све тестиране изолате ћелија *Candida*. Третман етарским уљем *S. montana* у концентрацијама МИК и ½ МИК резултирао је

исходом смањења формирања биофилма од више од 50%. Када се упореди хемијски састав уља овде истраживаног *S. montana* и састав уља *S. hortensis* приказаног у поменутој студији, уочава се подударност главних састојака. Међутим, приметна разлика се може видети у процентуалној заступљености доминантних једињења. Тимол је био присутан са 15,5% код врсте *S. montana* и 45,9% у случају *S. hortensis*, док је карвакрол чинио 24,3% и 12,8%, тим редоследом. Може се закључити да тимол има већу редукциону способност формирања биофилма и представља битан састојак етарских уља. Miranda-Cadena et al. (2021) испитивали су *in vitro* активност карвакрола, цинамалдехида и тимола на биофилмове кандиде. Њихови резултати су открили да тимол и карвакрол смањују биомасу већине биофилма, са концентрацијама од 0,812 mg/mL и 1,106 mg/mL, тим редоследом, како је утврђено КВ тестом. Сprovedено истраживање о активности биљних терпеноида на сојење *Candida* изолованих са хируршких уређаја показало је значајну редукцију формирања биофилма за 80% у присуству карвакрола у концентрацији од 2 mg/mL (Touil et al., 2020).

5.2. Хемијски састав, анти-*Candida* и антивирулентна активност етарских уља одабраних биљних врста породице Asteraceae

5.2.1. Хемијски састав етарских уља биљних врста *I. helenium* и *H. italicum*

Анализом хемијског састава етарског уља корена врсте *I. helenium* идентификовано је 25 различитих састојака који су чинили 93,4% узорка (табела 12). Два изомера еудезманских лактона, алантолактон и изоалантолактон, били су најзаступљенији са уделима 65,8% и 25,25%. Мање заступљени састојци (13 једињења) били су присутни у распону од 0,1% до 1,9%, док су сви остали састојци идентификовани у траговима. Овакав хемијски профил био је у складу са претходним студијама о хемијском саставу етарског уља врсте *I. helenium*, где су поменути лактони представљали 80% етарског уља омана (Bourrel et al., 1993; Deriu et al., 2008; Hernandez-Ochoa et al., 2012; Lokhande et al., 2007; Stojanović-Radić et al., 2012). Слични подаци добијени су у истраживању Bourrel et al. (1993) где су алантолактон (52,4%) и изоалантолактон (33,0%) идентификовани као доминантни састојци етарског уља врсте *I. helenium*. У оквиру нашег истраживања, тестирани узорак уља омана карактерисала је знатно већа количина алантолактона (51,3-56,6%) и нешто нижа количина изоалантолактона (26,6-37,3%) у поређењу са претходно наведеним студијама.

Lokhande et al. (2007) су у свом истраживању изнели податке о хемијском саставу и инхибиторној активности главних састојака изолованог етил-ацетатног екстракта корена врсте *I. racemosa*. Доминантна једињења била су алантолактон, изоалантолактон и дихидроалантолактон при чему је утврђена и његова значајна антимикуробна активност на различите сојеве бактерија. Истраживачи Güleç et al. (2024) анализирали су старска уља надземних делова сродне врсте *I. germanica* L. која су добијена хидродестилационом методом. Резултати су показали да се хемијски профил мења у односу на тип изоловања, где је конвенционалном методом добијено уље са високим садржајем сесквитерпена, а доминантни састојци били су алкохол α -бисаболол (30,1%) и киселина 12-карбоксиеудесма-3,11(13)-диен (14,9%), док је уље добијено модификованом методом садржало висок проценат монотерпена, примарно α -пинен (8,9%) и 1,8-синеол (9,5%) (Güleç et al., 2024).

Табела 12. Хемијски састав старских уља одабраних врста породице Asteraceae

RI ^a	Састојак	Садржај (%) ^b		Метода идентификације ^b
		<i>H. italicum</i>	<i>I. helenium</i>	
800	Хексанал	н.д. ^д	0,1	RI, MS, CoI
806	Бутил-ацетат	н.д.	0,1	RI, MS, CoI
907	Циклофенен	н.д.	тр. ^г	RI, MS, CoI
932	α -Пинен	8,3	н.д.	RI, MS, CoI
946	α -Фенхен	0,5	н.д.	RI, MS
948	Камфен	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
951	Туја-2,4(10)-диен	тр.	н.д.	RI, MS
976	β -Пинен	0,3	0,1	RI, MS, CoI
995	Изобутил-2-метилбутаноат	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1022	<i>p</i> -Цимен	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1026	Лимонен	0,7	н.д.	RI, MS, CoI
1028	1,8-Синеол	0,7	тр.	RI, MS, CoI
1042	Изобутил-ангелат	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1066	<i>cis</i> -Линалоол-оксид (фураноидни)	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1083	<i>trans</i> -Линалоол-оксид (фураноидни)	0,1	н.д.	RI, MS, CoI
1095	Линалоол	1,0	н.д.	RI, MS, CoI
1118	<i>exo</i> -Фенхол	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1122	<i>trans-p</i> -Мента-2,8-диен-1-ол	тр.	н.д.	RI, MS
1125	α -Камфоленал	0,8	н.д.	RI, MS
1142	<i>trans</i> -Пинокарвеол	0,5	н.д.	RI, MS, CoI
1145	Изоамил-ангелат	2,5	н.д.	RI, MS, CoI
1148	Камфор	н.д.	тр.	RI, MS, CoI

1159	Албен	н.д.	0,1	MS, CoI
1164	Пинокарвон	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1173	Борнеол	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1182	Терпинен-4-ол	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1197	α -Терпинеол	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1199	Миртенал	0,6	н.д.	RI, MS, CoI
1211	Вербенон	0,7	н.д.	RI, MS, CoI
1224	<i>cis</i> -Карвеол	тр.	н.д.	RI, MS
1250	Карвон	тр.	н.д.	RI, MS
1281	(Z)-3-Хексенил-ангелат	0,4	н.д.	RI, MS
1288	<i>trans</i> -Вербенил-ацетат	тр.	н.д.	RI, MS
1350	Лимонен-гликол	тр.	н.д.	RI, MS
1355	Нерил-ацетат	13,4	н.д.	RI, MS
1371	α -Иланген	0,4	н.д.	RI, MS
1378	Изоиталицен	тр.	н.д.	RI, MS
1394	β -Елемен	н.д.	0,3	MS, CoI
1409	Италицен	3,5	н.д.	RI, MS
1413	α - <i>cis</i> -Бергамотен	1,1	н.д.	RI, MS
1422	(E)-Кариофилен	н.д.	0,1	RI, MS, CoI
1434	α - <i>trans</i> -Бергамотен	0,7	н.д.	RI, MS
1441	4,6,9-Триметилдека-8-ен-3,5-дион (дикето таутомер)	тр.	н.д.	RI, MS, CoI
1440	Дихидро- β -јонон	н.д.	тр.	RI, MS
1449	<i>epi</i> - β -Сантален	н.д.	тр.	RI, MS
1444	Нерил-пропионат	3,4	н.д.	RI, MS
1462	β -Сантален	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1468	α -Акорадиеен	0,4	н.д.	RI, MS
1472	β -Акорадиеен	0,4	н.д.	RI, MS
1475	4,5-ди- <i>epi</i> -Аристолохен	тр.	0,2	MS, CoI
1477	Селина-4,11-диен	тр.	н.д.	RI, MS
1481	γ -Куркумен	10,4	н.д.	RI, MS
1485	2,4,6,9-Тетраметилдека-8-ен-3,5-дион, дијастереомер I (дикето таутомер)	тр.	н.д.	RI, MS
1494	β -Селинен	9,3	0,5	MS, CoI
1501	α -Селинен	1,5	тр.	MS, CoI
1508	Гермакрен А	н.д.	0,1	MS, CoI
1517	γ -Кадинен	0,6	н.д.	RI, MS
1527	<i>cis</i> -Каламенен	тр.	н.д.	RI, MS
1555	Италицен-епоксид	0,8	н.д.	RI, MS
1572	3,5,7,10-Тетраметиландека-9-ен-4,6-дион, дијастереомер I (дикето таутомер)	1,7	н.д.	RI, MS
1580	Елеменал	н.д.	0,2	RI, MS, CoI
1581	<i>ar</i> -Тумерол	0,8	н.д.	RI, MS
1589	Кариофилен-оксид	6,3	0,2	RI, MS, CoI

1616	Хумулен-епоксид II	0,8	н.д.	RI, MS
1649	3-Метилтетрадекан-2-он	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1901	Сесквитерпенски лактон 1 (C ₁₅ H ₂₂ O ₂)	н.д.	тр.	
1915	Алантактон	н.д.	65,8	RI, MS, CoI
1931	Сесквитерпенски лактон 2 (C ₁₅ H ₂₂ O ₂)	н.д.	0,4	
1954	Изоалантактон	н.д.	25,5	RI, MS, CoI
1957	Сесквитерпенски лактон 3 (C ₁₅ H ₂₂ O ₂)	н.д.	1,9	
1967	Сесквитерпенски лактон 4 (C ₁₅ H ₂₂ O ₂)	н.д.	0,6	
Укупно:		72,6	96,0	

^aЕкспериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони у односу на серију C₇-C₄₀ *n*-алкана. ^bСредње вредности три анализе. ^cRI – идентитет једињења потврђен поређењем ретенционих индекса; MS – идентитет једињења потврђен поређењем масених спектра; CoI – идентитет једињења потврђен експериментом ко-инјекције са стандардом. ^dтр. количине у траговима (< 0,05%). ^eн.д. – једињење није детектовано. *syn.* – синоним.

Анализом етарског уља *H. italicum* (Roth) G. Don идентификована су укупно 52 једињења применом GC/MS анализе (табела 12), а најзаступљенији састојци били су нерил-ацетат (13,4%), γ -куркумен (10,3%), β -селинен (9,3%) и α -пинен (8,3%). Све остали идентификовани састојци били су присутни у значајно нижим концентрацијама у комерцијалном узорку етарског уља смиља.

Главни састојци (нерил-ацетат, γ -куркумен, β -селинен и α -пинен) су, такође, били најзаступљенији у узорцима етарских уља *H. italicum* које су испитивали други аутори (Aćimović et al., 2021; Staver et al., 2018; Tzanova et al., 2018). У својој студији, Tzanova et al. (2018) истраживали су хемијске профиле етарских уља добијених из *H. italicum*, која је интродукована са Корзике (Француска), а узгајана у јужној Бугарској. Користећи GC/MS методу, идентификовали су укупно 41 састојак. Главна једињења етарског уља били су α - и γ -куркумен (12,5–25,8%), нерил-ацетат (12,0–20,6%) и α -пинен (5,6–19,5%). Staver et al. (2018) користили су свеже надземне делове *H. italicum* из средње Далмације, Хрватска, које су хидродестиловали да би се анализирао хемијски састав уља. Идентификовано је укупно 38 једињења, при чему су α -пинен (21,6%) и нерил-ацетат (7,9%) били најзаступљенији састојци етарског уља.

Насупрот томе, резултати студије Ćavar Zeljković et al. (2015) открили су специфичан хемијски састав етарског уља *H. italicum* са различитих локација дуж јадранске обале у Хрватској. Уља су била изузетно богата сесквитерпенским угљоводоницима, при чему су доминантна једињења била изомери куркумена (Ćavar Zeljković et al., 2015). Хемијски

састав етарског уља смиља није у потпуности проучен, тако у истраживању Aćimović et al. (2021) детектовано је укупно 70 једињења, од којих 17 неидентификованих састојака чини 8,5% укупног састава. Доминантна једињења била су γ -куркумен (13,6%), β -селинен (12,2%) и α -пинен (11,8%), а затим β -кариофилен (6,7%) и *ar*-куркумен (5,0%). Важно је нагласити да антифунгални ефекат етарског уља смиља у великој мери зависи од хемијског састава који може варирати у зависности од хемотипа (Aćimović, 2023).

5.2.2. Испитивање анти-*Candida* активности одабраних етарских уља

Алантаолактон изолован из корена омана показао је антиинфламаторну (Rao Kurma & Mishra, 1997), антимикотичку (Bourrel et al., 1993; Wahab et al., 1981), антибактеријску (Cantrell et al., 1999; Tosun et al., 2005) и антитуморску активност (Wang et al., 2007). Изоалантаолактон се показао као ефикасан антимикробни агенс, испољавао је значајну инхибиторну активност на бактерије (Cantrell et al., 1999; Liu et al., 2001) и гљиве (Tan et al., 1998). Минималне инхибиторне концентрације етарског уља корена *I. helenium* испитиваног на клиничке изолате *Candida* spp. и стандардни лабораторијски сој *C. albicans* ATCC 24433, приказане су у табели 13. Добијене вредности МИК-а за етарско уље омана биле су различите међу сојевима, али су генерално показале висок анти-*Candida* потенцијал (0,009-0,312 mg/mL). Изолат 10 можемо издвојити као најосетљивији на третман уљем омана при чему је концентрација од 0,009 mg/mL била довољна за ефекат инхибиције раста. Нистатин је коришћен као позитивна контрола у овом експерименту и показао је бољу активност.

На основу прегледаних литературних података може се уочити веома висок анти-*Candida* потенцијал секундарних метаболита различитих врсти омана или његових главних састојака (Bourrel et al., 1993; Budán et al., 2021; Deriu et al., 2008; Güleç et al., 2024; Liu et al., 2001; Saltan et al., 2022; Yang et al., 2022; Žugić et al., 2013). У истраживању Bourrel et al. (1993) приказана је ефикасност етарског уља *I. helenium* на референтни сој *C. albicans* при концентрацији од 62,5 μ g/mL, док је клинички изолат исте врсте био инхибиран након третмана са 40 μ g/mL уља (Žugić et al., 2013). Истраживачи Deriu et al. (2008) приказали су значајне податке о високој ефикасности овог уља (МИК од 0,0009 до 0,6 μ g/mL) против различитих врста клиничких изолата кандида, укључујући *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilopsis* и *C. tropicalis*. У раду Budán et al. (2021), антимикробни потенцијал екстракта корена *I. helenium* тестиран је на 7 врста бактерија (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (MRSA),

Streptococcus pyogenes, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *E. coli* D31, *Pseudomonas aeruginosa*) и 6 врста гљива (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*). Минималне вредности антифунгалне активности испитиваног екстракта кретале су се од 50 до 100 µg/mL или више.

У истраживању Saltan et al. (2022) приказани су подаци о анти-*Candida* активности три врсте естракта (етил-ацетатни, метанолни и инфузиони) биљне врсте *I. oculus-christi* L. МИК вредности на испитивани референтни сој врсте *C. albicans* ATCC 10231 био је у распону од 78 до 125 µg/mL, док је за референтни *C. krusei* ATCC 6258 био од 39 до 125 µg/mL. Истраживачи Güleç et al. (2024) анализирали су инхибиторну активност етарских уља надземних делова врсте *I. germanica* L. на различите врсте бактерија и гљива. Добијени подаци су потврдили антифунгални ефекат омана при чему су се МИК вредности кретале у распону од 125 до 1000 µg/mL. У поређењу са подацима нашег истраживања, етарско уље *I. helenium* показало је значајно бољу анти-*Candida* активност са најнижом МИК вредношћу од 9 µg/mL, док је највиша износила 312 µg/mL.

У студији Yang et al. (2022) приказани су резултати испитивања антифунгалне активности алантолактона на различите референтне сојеве врсте рода *Candida*. Вредности минималних концентрација потребних за инхибицију раста биле су у распону од 18 до 72 µg/mL што је слично са подацима нашег тестирања етарског уља корена омана и утврђеним хемијским саставом при чему су били доминантни – сесквитерпенски лактони. Liu et al. (2001) истраживали су активност супстанце изоалантолактон који представља главни састојак етарског уља омана, и утврдили су висок проценат инхибиције (74,0%) при концентрацији од 500 µg/mL. Barrero et al. (2000) су тестирали четрдесет пет сесквитерпенских лактона због потенцијалне антифунгалне активности против *Microsporum cookei*, *Trichophyton mentagrophytes* и *Fusarium* spp. Скрининг тестови су показали да већина испитиваних сесквитерпена поседује барем слабу антифунгалну активност, што се може потврдити и нашим истраживањем обзиром да је уље омана показало веома значајан анти-*Candida* ефекат.

Табела 13. Минималне инхибиторне концентрације етарских уља одабраних одабраних биљних врста породице Asteraceae

Бр.	Изолати	<i>H. italicum</i>	<i>I. helenium</i>	Нистатин
		МИК (mg/mL)	МИК (mg/mL)	МИК (mg/mL)
1	<i>Candida albicans</i>	5,000	0,156	0,009
2	<i>Candida albicans</i>	1,250	0,078	0,004
3	<i>Candida krusei</i>	0,312	0,078	0,009
4	<i>Candida albicans</i>	2,500	0,156	0,004
5	<i>Candida albicans</i>	1,250	0,156	0,019
6	<i>Candida albicans</i>	0,625	0,156	0,004
7	<i>Candida krusei</i>	0,625	0,156	0,004
8	<i>Candida albicans</i>	2,500	0,312	0,009
9	<i>Candida albicans</i>	1,250	0,078	0,004
10	<i>Candida krusei</i>	0,312	0,009	0,002
11	<i>Candida albicans</i>	0,625	0,039	0,004

МИК–Минимална инхибиторна концентрација; Анти-*Candida* активност=значајна (МИК<2 mg/mL); средња (МИК 2–4 mg/mL); слаба (МИК>4 mg/mL) (Ahmad et al., 2014)

У табели 13 су приказане минималне концентрације етарског уља *H. italicum* потребне за инхибицију раста клиничких изолати кандиди и референтног соја *C. albicans* ATCC 24433. Подаци добијени методом микродилуције показали су значајан антифунгални потенцијал са вредностима МИК-а у распону од 0,312 до 5 mg/mL. Изолати врсте *C. krusei* били су посебно осетљиви на третман уљем, при чему се инхибиција раста ћелија јавила при концентрацији од 0,312 mg/mL (изолати 3 и 10).

Упоређујући наше резултате са онима који су раније објављени у литератури, етарско уље *H. italicum* показује изузетан инхибиторни ефекат против сојева *Candida* (Bacic et al., 2021; Djihane et al., 2017; Mastelic et al., 2005; Staver et al., 2018; Zheljazkov et al., 2022). У студији Mastelic et al. (2005) истраживали су хемијски састав и антимикуробни потенцијал етарског уља *H. italicum* из Хрватске. У експерименту су тестирани одабрани сојеви *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и *C. albicans*. Налази су потврдили да је етарско уље значајно инхибирало раст квасца *C. albicans* и Грам-позитивне бактерије *S. aureus*. Истраживање

Djihane et al. (2017) показало је да *C. albicans* ATCC 10231 има највећу осетљивост (6,325 µg/mL) на дејство етарског уља смиља. У њиховој студији, надземни делови *H. italicum* сакупљени су у јуну 2013. током периода цветања из Бејаје, северни Алжир. Етарско уље из ове колекције карактерише висок садржај оксигенованих сесквитерпена (76,7%) и монотерпена (61,4%). Главни састојци били су α -цедрен (13,6%), α -куркумен (11,4%), геранил-ацетат (10,1%), лимонен (6,1%), нерол (5,0%), нерил-ацетат (4,9%) и α -пинен (3,8%). Значајнија анти-*Candida* активност њиховог узорка може се објаснити различитим хемијским профилем уља при чему су главни састојци нашег узорка били нерил-ацетат (13,4%), γ -куркумен (10,3%) и β -селинен (9,3%). Staver et al. (2018) описали су ефекте етарског уља *H. italicum*, пореклом из средње Далмације (Хрватска), на различите микроорганизме. Посебно, у концентрацији од 6,4 mg/mL, уље је испољило антимикуробни ефекат на клиничке изолате *S. aureus* MRSA, *S. epidermidis* и *C. albicans*. Насупрот томе, наше истраживање је показало још значајније резултате: раст референтног соја *C. albicans* ATCC 24433 био је инхибиран при концентрацији од 0,625 mg/mL, док су сви клинички изолати рода *Candida* инхибирани у концентрацијама ≤ 5 mg/mL.

Студија Basic et al. (2021) испитивала је хемијски састав и антимикуробно дејство етарског уља *H. italicum* из Босне и Херцеговине. Идентификована је укупно 41 једињење, а главни састојци били су α -пинен, нерил-ацетат, γ -куркумен и β -селинен. Када је тестирано против референтног соја *C. albicans* ATCC 10231 методом диск дифузије, етарско уље је показало слабу анти-*Candida* активност (зона инхибиције чистог уља – 8,5 mm). Zheljazkov et al. (2022) приказали су хемијски састав и антимикуробни потенцијал етарских уља из врста *Helichrysum arenarium* (L.) Moench и *H. italicum*. Они су тестирали етарска уља *H. italicum* добијена од биљака увезених из Босне, Корзике и Француске. Главни идентификовани састојци су били нерил-ацетат (4,0–14,9%) и β -химахален (9,9–10,9%). Резултати добијени методом диск дифузије показали су умерену антигљивичну активност против *C. krusei* и *C. tropicalis*, при чему је највећа активност уочена против Грам-позитивне бактерије *S. aureus*. Претходно објављени подаци о антифунгалним својствима етарског уља смиља у литератури подстакли су нас да истражимо његов синергистички потенцијал и антибиофилм ефекат против различитих клиничких изолата врсте *Candida*.

5.2.3. Праћење анти-*Candida* активности етарских уља током времена

Етарско уље корена *I. helenium* испитивано је употребом методе за одређивање активности при чему је потребна мања количина узорка уља обзиром на чињеницу да је био ограничен волумен хидродестилованог уља. Након реализоване микродилуционе методе (48 сати инкубације) из сваког бунарчића је пренето 10 μL садржаја на претходно припремљене стерилне СДА подлоге. На овај начин могу се одредити минималне концентрације агенса довољне за заустављање раста односно потпуног заустављања раста ћелије квасаца. Петри плоче са пренетим узорцима су инкубиране на 35 °C а потом су очитани резултати који су презентовани у табели 14.

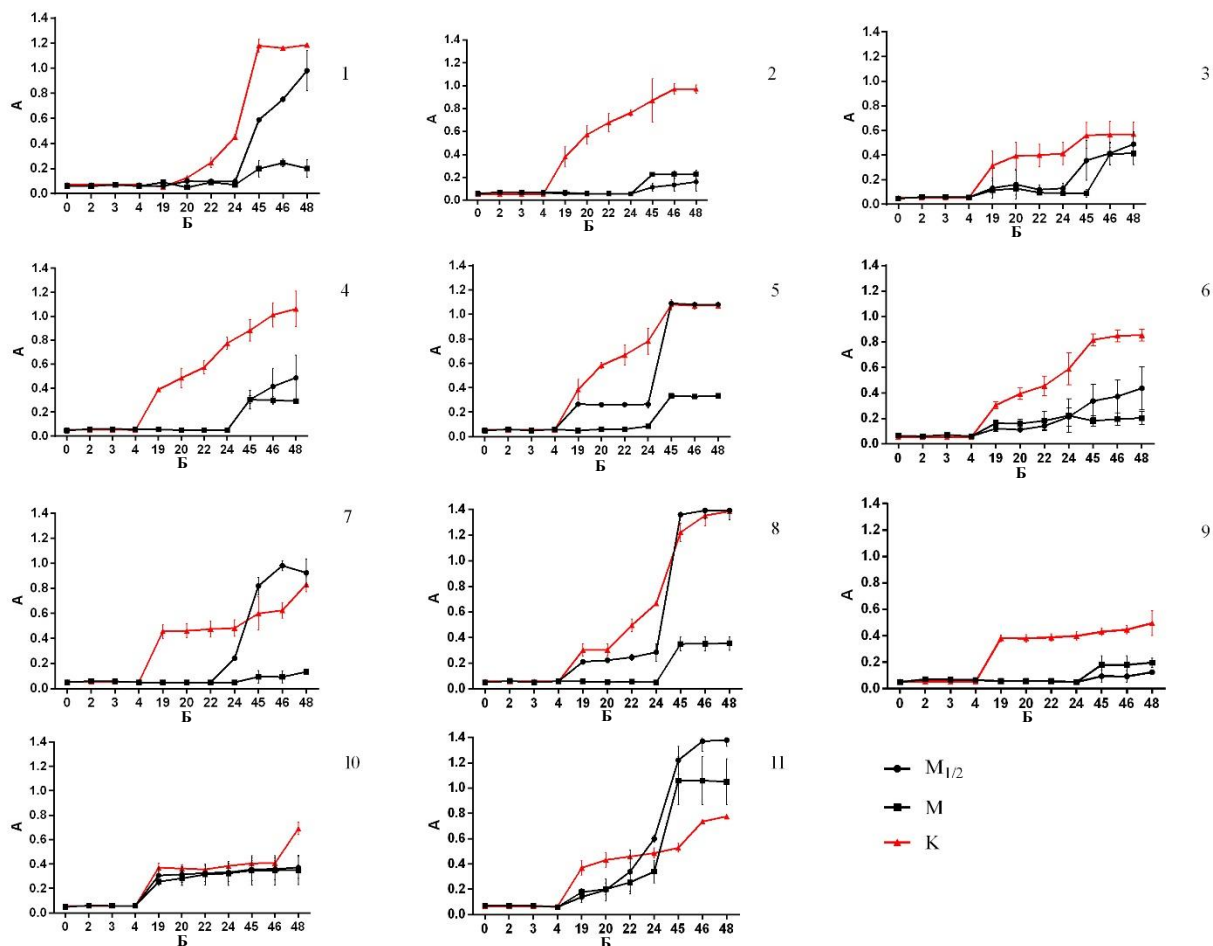
Табела 14. Минималне фунгицидне концентрације етарског уља *I. helenium*

Бр.	Изолати	<i>I. helenium</i>
		МФК (mg/mL)
1	<i>Candida albicans</i>	0,625
2	<i>Candida albicans</i>	0,156
3	<i>Candida krusei</i>	0,312
4	<i>Candida albicans</i>	1,250
5	<i>Candida albicans</i>	1,250
6	<i>Candida albicans</i>	1,250
7	<i>Candida krusei</i>	1,250
8	<i>Candida albicans</i>	2,500
9	<i>Candida albicans</i>	0,156
10	<i>Candida krusei</i>	0,156
11	<i>Candida albicans</i>	0,312

МФК – минимална фунгицидна концентрација.

Тестирано уље омана је показало високу ефикасност убијања планктонских форми *Candida* што га класификује као ефективног кандидата за детаљнија испитивања његовог анти-*Candida* потенцијала. Као што је приказано у табели 14, итврђено је да етарско уље *I. helenium*, у опсегу концентрација од 0,156 до 2,5 mg/mL, потпуно зауставља раст сојева

Candida што представља веома значајан резултат истраживања. Овим испитивањем примећено је да су МИК вредности биле повећане 2 до 8 пута како би се потпуно инхибирао раст планктонских форми квасаца што имплицира да способност уља да инхибира или заустави ћелијски раст директно зависи од специфичности клиничког изолата *Candida*.



Слика 18. Праћење анти-*Candida* активности етарског уља врсте *H. italicum* током времена. Статистичка анализа – двофакторска ANOVA са Tukey post hoc тестом, $p < 0,05$.

$M_{1/2}$ – $\frac{1}{2}$ МИК; М – МИК; К – контрола; А – апсорбанца; Б – временски период.

Праћена је инхибиторна активност етарског уља *H. italicum* током периода од 48 сати на раст планктонских ћелија кандиди. На графиконима су (слика 18) представљене криве раста популације ћелија пре и након третмана двама концентрација (МИК и $\frac{1}{2}$ МИК) етарског уља смиља. Из приказаних резултата можемо закључити да је тестирано уље

показало веома значајан ефекат у смањењу бројности ћелија кандида. При концентрацији МИК утврђена је висока ефикасност код 54,5% од укупног броја тестираних изолата (изолати 1, 2, 4, 7, 8 и 9), при чему је код већине дошло до опоравка ћелија након 24 сата инкубације. Уље је такође било ефикасно при $\frac{1}{2}$ МИК, значајно инхибирајући раст ћелија сојева 1, 2, 3, 4, 7 и 9 током првих 24 сата третмана. Најосетљивији изолат на утицај обема концентрацијама уља *H. italicum* био је изолат 2 где је редукциона способност након 48 сати, при МИК дози износила 76,8% а при $\frac{1}{2}$ МИК 83,5%.

До данас нисмо пронашли доступну литературу која би директно упоредила наше податке о антифунгалном дејству етарског уља смиља на клиничке изолате *Candida*, узročника кандидозе, праћено у одређеним временским интервалима током 48 сати инкубационог периода. Инхибиторни утицај врсте *H. italicum* на раст хуманих клиничких изолата није довољно истражен док постоје објављена истраживања на тему његовог утицаја на референтне лабораторијске сојеве *Candida* као што је представљено у одељку 5.2.2.

5.2.4. Тип интеракције уља комбинованих са нистатином/другим уљима

Да би се истражили могући терапијски приступи који би се могли применити у будућности, испитиван је тип интеракције етарских уља са стандардним антимиотиком, нистатином. Реализовани експерименти су били усмерени на могућност интеракције две испитиване супстанце која би резултирала појачаним дејством против сојева *Candida* у случају њихове комбиноване терапије.

У овој студији, комбинација уља корена *I. helenium* и нистатина показала је изузетно високу синергију у њиховом анти-*Candida* дејству (табела 15). Представљени ФИК индекси били су 0,031 и 0,125 указујући на веома висок потенцијал етарског уља омана као агенса који би повећао ефикасност антифунгалне терапије. Ово може бити последица хемијског састава уља корена омана, где су били доминантни сесквитерпенски лактони. Колико смо упознати нема доступних радова о синергистичком потенцијалу уља омана, па стога ова студија може значајно допринети даљим и детаљнијим испитивањима његове активности.

Табела 15. Синергистички потенцијал комбинације етарских уља са нистатином на клиничке изолате *Candida* spp. и референтног соја *C. albicans* ATCC 24433

Комбинације	<i>Candida albicans</i> ATCC 24433			<i>Candida krusei</i> 7			<i>Candida albicans</i> 9		
	МИК _п	МИК _к	ФИК	МИК _п	МИК _к	ФИК	МИК _п	МИК _к	ФИК
<u>H/NY</u>									
<i>H. italicum</i>	0,625	0,039	0,062	0,625	0,078	0,125	1,250	0,312	0,25
Нистатин	0,004	0,0005	0,125	0,004	0,0005	0,125	0,004	0,001	0,25
*ФИКИ			0,187			0,25			0,50
Интеракција			С			С			С
<u>I/NY</u>									
<i>I. helenium</i>	0,156	0,0024	0,015	0,156	0,0097	0,0625	0,078	0,0048	0,0625
Нистатин	0,004	0,00006	0,015	0,004	0,00025	0,0625	0,004	0,00025	0,0625
*ФИКИ			0,031			0,125			0,125
Интеракција			С			С			С

МИК_п-минимална инхибиторна концентрација појединачно (mg/mL); МИК_к-минимална инхибиторна концентрација у комбинацији (mg/mL); ФИК-фракциона инхибиторна концентрација; ФИКИ-фракциони инхибиторни концентрациони индекс. *H/NY* – *H. italicum*/Нистатин; *I/NY* – *I. helenium*/Нистатин. С – синергизам; А – адитивни ефекат; Ант. – антагонизам. *ФИКИ је тумачен као синергистички ефекат када је $\leq 0,5$, као адитивни или индиферентан када је $> 0,5$ и ≤ 2 , и као антагонистички када је његова вредност > 2 .

Литературни подаци о испитивању типа интеракције природних супстанци међусобно, као и комбинацији са стандардним антимицотичким препаратима наглашавају важност истраживања потенцијално новог приступа лечењу кандидоза (Amber et al., 2010; de Castro et al., 2015; Silva et al., 2011; Stringaro et al., 2014). Студија de Castro et al. (2015) демонстрирала је синергизам тимола и нистатина са ФИКИ вредности од 0,25 на сојеве *C. albicans*, *C. krusei* и *C. tropicalis* што је резултирало смањењем од 87,4% МИК. Слично томе, у нашем истраживању смањење МИК вредности кретало се до 98,5% (65 пута мања МИК) што указује на веома значајан ефекат *I. helenium* на хумане изолате квасца из рода *Candida*. Stringaro et al. (2014) показали су да етарско уље *Mentha suaveolens* у комбинацији са флуконазолом и микафунгином има синергистичко дејство (ФИКИ 0,375 и 0,531, тим редоследом) на један клинички изолат *C. albicans*. Такође, утврђено је да су ФИК индекси етарског уља *Coriandrum sativum* комбинованог са амфотерицином Б били 0,375, 0,185 и

1,00 у односу на *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 24433 и *C. tropicalis* ATCC 750 (Silva et al., 2011). Етарско уље *Ocimum sanctum* показало је висок синергистички потенцијал и са флуконазолом и са кетоназолом на укупно 90 сојева *Candida*, укључујући клиничке изолате, као и референтне сојеве (Amber et al., 2010). На основу поменутих студија јасно се може уочити да је уље корена *I. helenium* показало већи синергистички потенцијал на сојеве *Candida* и може се сматрати перспективним кандидатом за даља испитивања и укључивање у комбиновану антифунгалну терапију против кандидоза.

У табели 15 представљени су подаци тестирања уља *H. italicum* и антифунгалног агенса. Овим тестом процењени су референтни сој и два представника хуманих клиничких изолата *Candida*. Уочен је синергистички ефекат између уља смиља и нистатина у односу на стандардни сој *C. albicans* ATCC 24433, са ФИК индексом од 0,187. Ова врста интеракције примећена је и против изолата 7 (*C. krusei*), са ФИК индексом од 0,25, као и против изолата 9 (*C. albicans*). Значајно је да нису примећене антагонистичке интеракције између испитиваних супстанци. Такође, важно је истаћи да су се вредности МИК-а које указују на инхибицију раста, значајно смањиле (до 16 пута) у односу на вредности добијене микродилуционом методом. Ова чињеница имплицира да се слични антифунгални ефекти могу постићи нижим дозама антифунгалних агенаса, што показује кооперативну интеракцију између испитиваних супстанци.

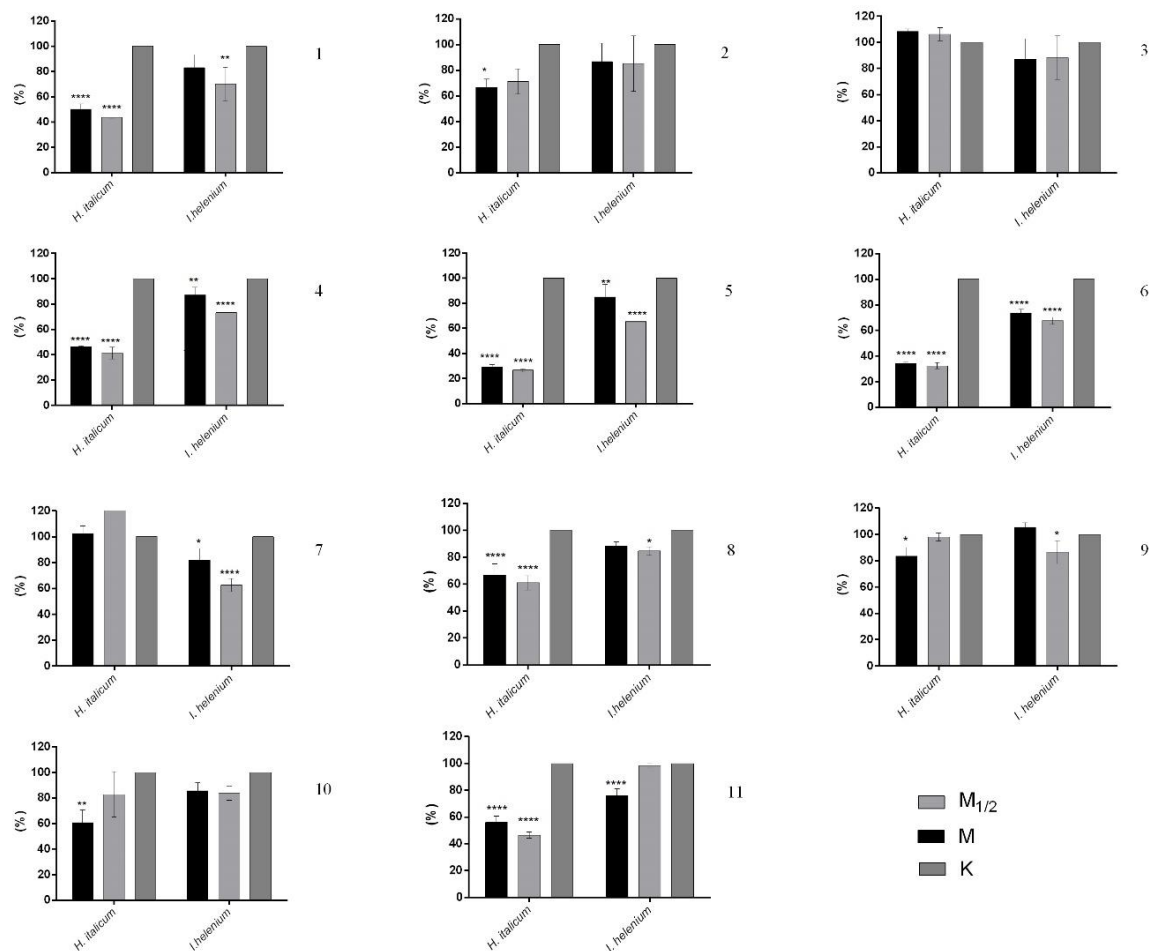
Према постојећој литератури, неколико студија истиче синергистички потенцијал етарских уља (Blanc et al., 2023; Orchard et al., 2019; Soulaïmani et al., 2021). Нисмо пронашли ниједну доступну студију која би директно упоредила наше резултате о интеракцији између комерцијалног узорка смиља (*H. italicum*) и антифунгалног агенса, нистатина, на хумане изолате кандиде. Резултати нашег истраживања су показали да је уље смиља значајно инхибирало раст планктонских ћелија кандиде, како као самостални третман тако и у комбинацији са нистатином. Ови резултати наглашавају важност истраживања потенцијалног синергизма етарских уља, јер би таква истраживања могла допринети развоју нових стратегија за лечење гљивичних инфекција.

5.2.5. Антивирулентни ефекат

Испитивана је способност продукције биофилмова изолата кандиде, као и утицај етарског уља корена *I. helenium* на његову редукцију у два концентрацијама (МИК и $\frac{1}{2}$ МИК) (слика 19). Резултати уочени након 48 сати периода инкубације показали су да код четири клиничка изолата није забележен значајан утицај на продукцију биофилма. Код укупно четири соја (5, 4, 6 и 7), формирање биофилмова је смањено са статистичком значајношћу ($p < 0,0001$) код $\frac{1}{2}$ МИК дозе, док је овај ефекат примећен у концентрацијама МИК код само два соја (6 и 11). Највеће смањење од 31,6% на половини МИК и 26,9% на МИК уочено је у случају референтног лабораторијског соја *C. albicans* ATCC 24433. Када се посматрају добијени резултати, приметно је да су концентрације $\frac{1}{2}$ МИК показале већу ефикасност у редукцији биофилма него двоструко веће МИК вредности. Обе тестиране концентрације значајно су редуковале способност формирања биофилма само у случају врсте *C. albicans* ATCC 24433 што имплицира да је референтни сој био најосетљивији на третман уљем омана.

Истраживањем способности формирања биофилма врста *Candida*, проценили смо и потенцијал етарског уља *H. italicum* да инхибира стварање биофилма (слика 19). Примећено је значајно смањење формирања биофилма након третмана етарским уљем *H. italicum* у концентрацијама МИК и $\frac{1}{2}$ МИК код 54,5% од укупно тестираних клиничких сојева (изолати 1, 4, 5, 6, 8 и 11). Највеће смањење од 73,5% на половини МИК и 70,94% на МИК уочено је у случају клиничког изолата 5 што имплицира да је био најосетљивији на третман уљем смиља. Обе тестиране концентрације значајно су редуковале способност формирања биофилма и у случају врсте *C. albicans* ATCC 24433 при чему је редукција износила 65,6% при МИК а 67,5% при $\frac{1}{2}$ МИК дози.

С обзиром да нема доступне научне литературе која би директно упоредила наше податке о антибиофилм ефектима етарског уља *I. helenium* и *H. italicum* против клиничких изолата *Candida*, узрочника кандидозе, биће наведени резултати студија где се наглашава способност природних производа добијених из различитих биљака да инхибирају формирање биофилма рода *Candida* (Alviano et al., 2005; Hendry et al., 2009; Khan & Ahmad, 2012; Saharkhiz et al., 2012; Schillaci et al., 2008; Sudjana et al., 2012; Taweechaisupapong et al., 2012).



Слика 19. Антибиофилм активност етарских уља *I. helenium* и *H. italicum* на клиничке изолате *Candida*. Статистичка анализа – двофакторска ANOVA са Tukey post hoc тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ у односу на контролу. $M_{1/2}$ – $\frac{1}{2}$ МИК; М – МИК; К – контрола.

Студија Khan & Ahmad (2012) утврдила је антибиофилм активност етарских уља (*Cymbopogon citratus* и *Syzygium aromaticum*) на клиничке изолата сојева *Candida* и три референтна соја *C. albicans*. Највећа инхибиција способности формирања биофилма етарским уљем *S. aromaticum* (концентрација $\frac{1}{2}$ МИК) уочена је против изолата *C. albicans* и *C. albicans* SC5314 (47,61 и 42,92%, тим редоследом). С друге стране, етарско уље *C. citratus* је испољило мање значајну инхибицију кандидозних биофилмова од другог испитиваног уља (11,5% у концентрацији $\frac{1}{2}$ МИК). Наше истраживање утврдило је највећу инхибицију формирања биофилма етарским уљем омана у концентрацији $\frac{1}{2}$ МИК код

већине тестираних сојева. Ефекат етарског уља *Croton cajucara* и линалоола на референтни сој *C. albicans* ATCC 51501 испитиван је у студији Alviano et al. (2005). Од осталих тестираних сојева, сој *C. albicans* показао је највећу редукцију биофилма када је примењен линалоол. Sudjana et al. (2012) су истраживали способност редукције биофилма десет изолата *Candida* у присуству етарског уља *Melaleuca alternifolia*. Значајно смањење је примећено код скоро свих изолата на 0,25% уља. Истраживање Saharkhiz et al. (2012) је утврдило потпуну инхибицију формирања биофилма *C. albicans* и *C. dubliniensis* етарским уљем *Mentha piperita* у концентрацијама од 1 $\mu\text{l/mL}$ и 2 $\mu\text{l/mL}$, тим редоследом. Schillaci et al. (2008) истраживали су способност редукције биофилма *C. albicans* у присуству етарског уља *Boswellia papyrifera*. Резултати су показали дозно зависан ефекат овог уља, где је највећа инхибиција од 81,5% примећена при концентрацији од 88,3 $\mu\text{g/mL}$. Студија Hendry et al. (2009) показала је значајне ефекте уља еукалиптуса и 1,8-синеола на формирање бактеријског и кандидозног биофилма. Једињење 1,8-синеол показало је значајну редукциону способност формирања кандидозних биофилмова. Taweekaisupapong et al. (2012) истраживали су инхибиторни ефекат етарских уља на биофилмове *Candida*, при чему је уље лимунске траве показало највећу редукцију формирања биофилма оба изолата кандиде. Уље лимунске траве имало је већи антибиофилм ефекат на врсту *C. krusei* (46,0-79,0%) него према биофилм форми изолата *C. albicans* (16,0-41,0%).

Досадашња истраживања антибиофилм ефекта етарских уља и њихових састојака наглашавају значајност њиховог тестирања (Butassi et al., 2021; Karpiński et al., 2021). Рад Butassi et al. (2021) пружа свеобухватни преглед литературе (који покрива период од 2017. до маја 2021.) о етарским уљима, прополису, биљним екстрактима, алгама, лишајевима, метаболитима микроорганизама и наносистемима који садрже природне производе. Прегледно истраживање представља приказ података о потенцијалу поменутих једињења за *in vitro* и *in vivo* модулацију биофилма гљива. Ови подаци указују на то да различити биљни секундарни метаболити и њихова једињења поседују значајну активност инхибирајући формирање биофилма и смањујући зреле структуре биофилма изолата рода *Candida*. У прегледној студији Karpiński et al. (2021), 69 једињења изолованих из биљака које припадају различитим породицама показало је активност на биофилм форме кандиде. Међу овим једињењима, монотерпени су били најзаступљенији, а затим сесквитерпенски лактони и сесквитерпени. Узорци уља омана и смиља који су тестирани током ове студије,

садрже главна једињења која припадају категорији сесквитерпена и монотерпена, па ови састојци вероватно доприносе антибиофилм активности уоченој у нашем истраживању (слика 19). У својој студији, Manoharan et al. (2017) су тестирали 83 етарска уља у циљу испитивања њихове ефикасности против формирања биофилма *C. albicans*, укључујући етарско уље *Helichrysum coriaceum* (DC.) Harv. (Asteraceae). Резултати су показали значајну редукцију биофилма третираним етарским уљем смиља, које садржи β -кариофилен — сесквитерпенско једињење познато по својим биоактивним својствима (Manoharan et al., 2017).

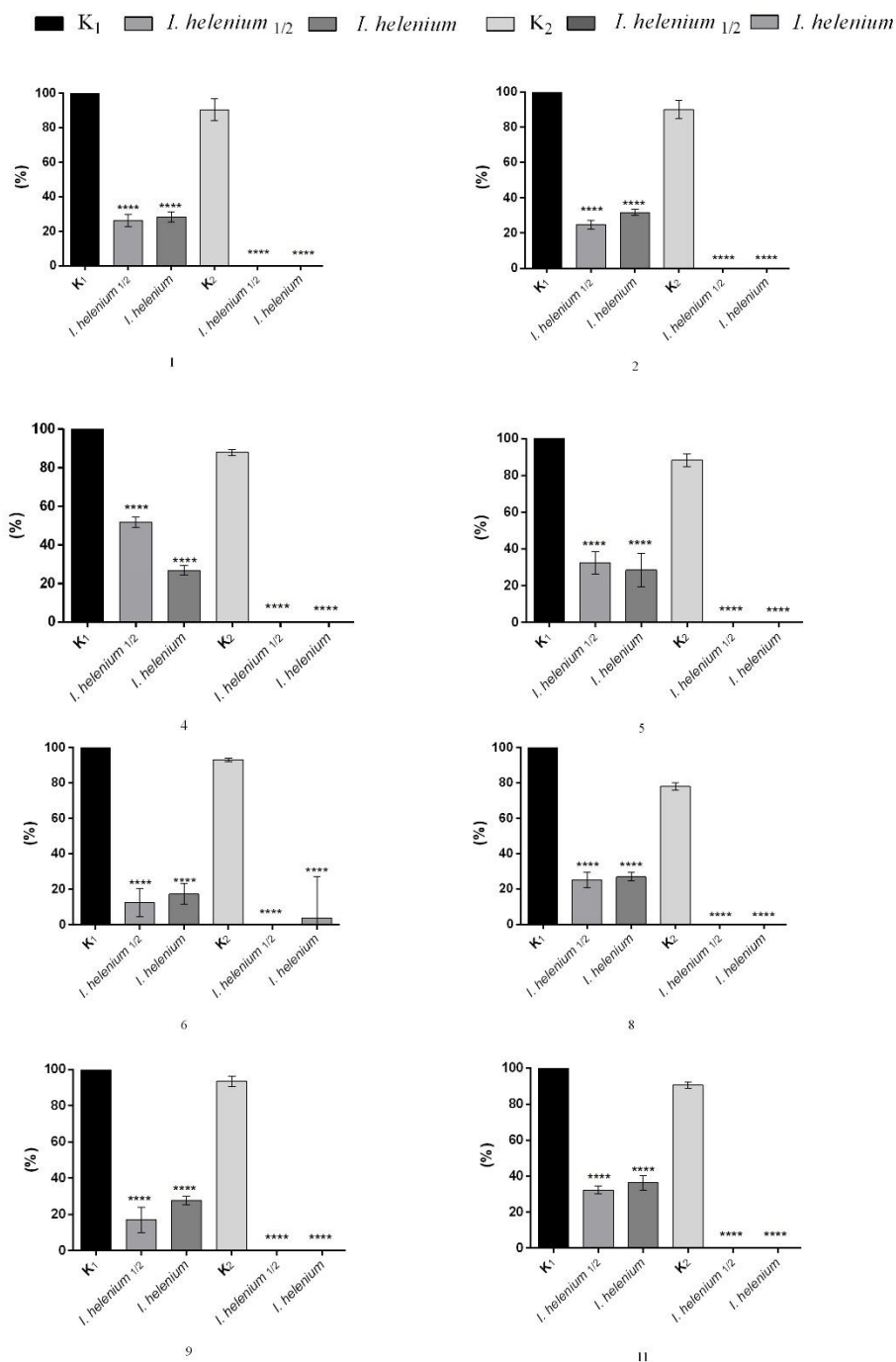
С обзиром на ограничену релевантну и доступну литературу о антифунгалном потенцијалу уља смиља (*H. italicum*) и уља корена омана (*I. helenium*) на планктонске и биофилмске облике рода *Candida*, наша студија даје драгоцен допринос текућим и будућим истраживањима у овој области.

5.2.5.1. Активност етарског уља врсте *I. helenium* L. на герминацију врсте *C. albicans* и продукцију ензима фосфолипазе

Етарско уље корена *I. helenium* показало је најистакнутији и најзначајнији ефекат инхибирања првог сета хуманих клиничких изолата у односу на остала етарска уља одабраних биљака која су била део ове докторске дисертације. Из овог разлога, спроведени су и додатни тестови његовог потенцијалног утицаја на остале факторе вируленције *Candida*, укључујући ефекат на герминацију сојева *C. albicans* и на продукцију/редукцију ензима фосфолипазе. *Candida albicans* има неколико морфолошких облика, односно ћелије квасца, герминационе цеви, праве хифе и псеудохифе. Прва фаза формирања правих хифа је формирање герминационих цеви из бластоконидија. Ова карактеристика је кључни фактор одговоран за патогенезу *Candida*, која омогућава продирање кроз епител и даљу инвазију. Интрацелуларно формирање герминационих цеви омогућава излазак фагоцитираних патогена из имуних ћелија, што ову диморфну транзицију чини једним од најважнијих фактора вируленције (Stojanović et al., 2016). Због тога је веома важно смањити или зауставити продукцију герминационих цеви како би се контролисао процес настанка и терапије кандидоза.

У овој студији испитивана је могућност продукције герминационих цеви клиничких изолата *C. albicans* и референтног соја *C. albicans* ATCC 24433, као и антивирулентна активност етарског уља *I. helenium* у концентрацијама МИК и $\frac{1}{2}$ МИК. Узимајући у обзир резултате укупног броја ћелија у третираној и контролној групи (K_1), може се уочити смањење броја у распону од 48,0% до 87,5% ($\frac{1}{2}$ МИК) и 64,0% до 83,5% (МИК). Највеће смањење броја планктонских ћелија уочено је код изолата 6 при чему је редукција износила 82,7% на МИК и 87,5% на $\frac{1}{2}$ МИК вредности (слика 20). Резултати ове студије показали су потпуну инхибицију (100%) продукције герминационих цеви код већине испитиваних изолата *C. albicans*, што је постигнуто применом обе концентрације етарског уља *I. helenium*. Изузетак је био изолат 5 код кога је примећена потпуна редукција герминације кандиди при $\frac{1}{2}$ МИК (100%) док је при МИК дози била 96,1%, у односу на контролну групу (K_2).

Претрагом литературе нисмо дошли до доступних података о испитивању уља корена омана на сојеве *C. albicans*, па ће зато у наставку бити наведене студије о утицају других природних производа биљака на редукцију/инхибицију формирања герминационих цеви (D'Auria et al., 2005; Gauch et al., 2014; Hammer et al., 2000; Henriques et al., 2007; Pinto et al., 2009; Schillaci et al., 2008; Taweekaisupapong et al., 2012). У раду Henriques et al. (2007) при тестирању фарнезола на *C. albicans* примећено је значајно смањење формирања герминационих цеви. Студија Taweekaisupapong et al. (2012) показала је инхибиторни ефекат етарског уља *Cymbopogon citratus* на формирање герминационих цеви. Поменуто уље је показало инхибиторну активност од 84,4%, док је једињење геранил-ацетата имало већи инхибиторни ефекат (99,5%) на герминацију кандиди. D'Auria et al. (2005) су истраживали потенцијални ефекат уља лаванде и два главна састојка на формирање герминационих цеви *C. albicans*, при чему је етарско уље *Lavandula angustifolia* показало потпуну инхибицију герминације у концентрацији од 0,9 $\mu\text{g/mL}$. Сви испитивани агенси су показали потпуну инхибицију герминације у поређењу са референтним сојем *C. albicans* ATCC 3153 при нижим концентрацијама (уље лаванде и линалоол – 0,62 $\mu\text{g/mL}$; линалил-ацетат – 0,31 $\mu\text{g/mL}$).



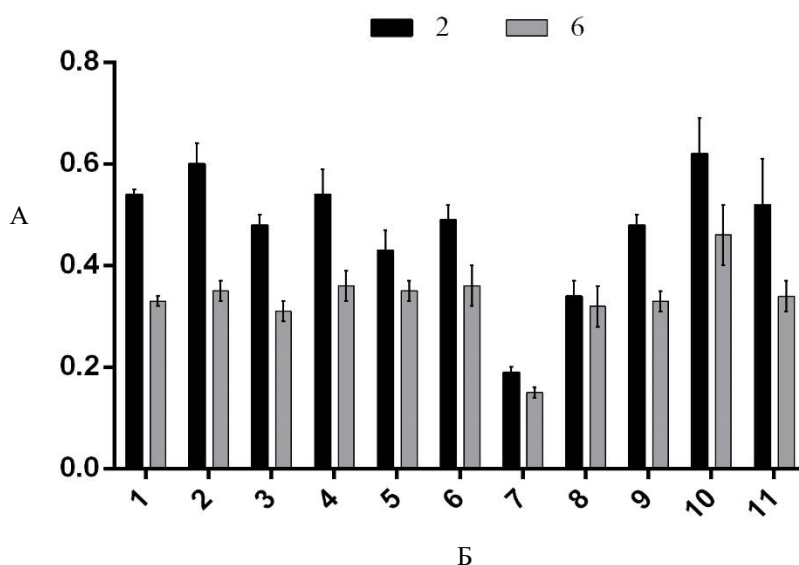
Слика 20. Антивирулентна активност старског уља *I. helenium* на герминацију изолата врсте *C. albicans*. Статистичка анализа – једнофакторска ANOVA са *Tukey post hoc* тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ у односу на контролу (K₁, K₂). K₁ – укупан број свих ћелија; K₂ – укупан број ћелија са герминационим цевима; *I. helenium* 1/2 – 1/2 МИК; *I. helenium* – МИК.

Потпуни инхибиторни ефекат (100%) етарског уља *Rosmarinus officinalis* примећен је код 5 изолата *Candida* од укупно 10 тестираних сојева. За осталих 5 сојева, проценат инхибиције продукције герминационих цеви варирао је од 63,0% до 94,0% (Gauch et al., 2014). Формирање герминационих цеви референтног соја *C. albicans* снажно је инхибирано од стране еугенола и уља каранфилића при концентрацији од 0,32 µg/mL (Pinto et al., 2009). Студија Schillaci et al. (2008) показала је инхибиторну активност етарског уља *Boswellia riviae* при концентрацији (МИК₅₀) од 0,12 µg/mL. Hammer et al. (2000) су истражили ефекат уља *Melaleuca alternifolia* на герминацију сојева *C. albicans*. Етарско уље има инхибиторни ефекат при концентрацији од 0,31 µg/mL за 10,0-68,5%, овај ефекат је детектован након 4 сата, док третман након 2 сата није дао значајне резултате. У нашем истраживању, уље корена *I. helenium* показало је апсолутну редукциону активност на формирање герминационих цеви при врло ниским концентрацијама након 2 сата. У поређењу са претходним студијама на ову тему, јасно је уочљиво да је етарско уље омана имало изузетну способност у односу на овај важан фактор вируленције кандидида.

Фосфолипазна активност сојева *Candida* spp. у контролној и третираној групи приказана у овом делу наше студије изражена је као П₃ вредност (Price et al., 1982). Експеримент је трајао 6 дана, међутим, значајна способност продукције ензима примећена је и након 2 дана инкубационог периода. Анализом добијених података уочено је да су на основу примене методе дифузије на чврстом агару, сви тестирани сојеви кандидида (100%) идентификовани као фосфолипаза-позитивни (слика 21).

Претходни научни радови наводе да клинички изолати *Candida* spp. углавном представљају продуценте фосфолипаза (Deorukhkar et al., 2014; Kantarcioglu & Yücel, 2002; Larkin et al., 2017; Mohandas & Ballal, 2011). Kantarcioglu & Yücel (2002) уочили су да 93,3% тестираних клиничких изолата *C. albicans*, узоркованих из грла, крви, респираторног тракта и урогениталног система не-имунокомпромитованих појединаца, продукују фосфолипазу. Студија Deorukhkar et al. (2014) сведочи о способности продукције овог ензима код 44,14% тестираних кандидида, док је максималну фосфолипазну активност имао изолат врсте *C. tropicalis*. У другом истраживању, највећи продуцент је била врста *C. guilliermondii* (П₃=0,07), а најслабији продуцент био је изолат *C. tropicalis* (П₃=0,27) (Mohandas & Ballal, 2011). Larkin et al. (2017) истраживали су факторе вируленције сојева *Candida* spp. при чему

је референтни сој *C. albicans* SC5314 био значајан продуцент поменутог ензима ($P_3=0,66$), док су укупно 37,5% испитиваних сојева *C. auris* били потврђени као продуценти овог ензима.



Слика 21. Продукција ензима фосфолипазе изолата рода *Candida*. 2 – продукција након 2 дана; 6 – продукција након 6 дана. Статистичка анализа – двофакторска ANOVA са *Tukey post hoc* тестом, $p<0,05$. А– вредност зоне продукције (P_3); Б – број изолата; $P_3<1,00$ - продуценти фосфолипазе, $P_3=1,00$ - не – продукујући сојеви *Candida*.

У нашем раду добијене вредности зоне продукције (P_3) у контролној групи биле су у опсегу 0,19-0,62 након 2 дана и 0,15-0,46 након 6 дана од почетка инкубације. Најјачи продуцент фосфолипазе био је изолат *C. krusei* (изолат 7, слика 21).

Међу досадашњим истраживањима наишли смо на један рад новијег датума где је испитивана инхибиторна активност екстракта и етарског уља *O. vulgare* на раст и факторе вируленције *C. albicans* (Vácz et al., 2024). Примећена је већа редукција продукције фосфолипазе након третмана етарским уљем у односу на екстракт органа. Зона преципитације била је смањена за 5,6% у случају екстракта, док је етарско уље редукovalo зону за 32,4%. Резултати нашег истраживања показали су да уље омана поседује изузетну антифосфолипазну активност с обзиром да је продукција ензима инхибирана код свих сојева након примене МИК дозе етарског уља у трајању од 2 и 6 дана.

Табела 16. Антифосфолипазна активност етарског уља корена *I. helenium*

Изолати	2 дана		6 дана	
	Контрола	МИК	Контрола	МИК
1	+	-	+	-
2	+	-	+	-
3	+	-	+	-
4	+	-	+	-
5	+	-	+	-
6	+	-	+	-
7	+	-	+	-
8	+	-	+	-
9	+	-	+	-
10	+	-	+	-
11	+	-	+	-

+: продуцент ($P_3 < 1$); - :није продуцент ($P_3 = 1$); (Mohandas & Ballal, 2011);
МИК-минимална инхибиторна концентрација

С обзиром да нисмо успели да дођемо до више публикованих научних радова о утицају етарских уља на овај фактор вируленције врста *Candida* spp., у наставку су приказана нека од истраживања антифосфолипазне активности различитих антимикотичких препарата или хемијских једињења (Ahmedi et al., 2022; Calamari et al., 2011). У студији Calamari et al. (2011) представљени су подаци продукције фосфолипазе од стране 10 изолата *C. albicans* након третмана трима референтним антимикотицима (хлорхексидин, флуконазол и хитозан) и примећено је значајно смањење зоне преципитације (P_3) у присуству примењених лекова. Ahmedi et al. (2022) су истражили утицај монотерпена лимонена на продукцију хидролитичких ензима. Резултати студије су показали значајну инхибицију продукције протеиназа и фосфолипаза при чему је коришћено четири концентрације тест супстанце. При вредностима МИК/8, МИК/4, МИК/2 и МИК, лимонен је редуковао продукцију фосфолипазе за 8,0%, 20,0%, 33,0% и 53,0%, тим редоследом.

5.3. Хемијски састав, анти-*Candida* и антивирулентна активност етарских уља одабраних биљних врста породице Rutaceae

Вулвовагиналне кандидозе представљају значајан проблем код жена пре свега због своје рекурентности и резистенције сојева на доступне антимикотичке препарате. Због тога смо део истраживања фокусирали искључиво на хумане изолате који су узорковани из

гениталног тракта жена. Испитивање је имало за циљ да се истражи деловање одабраних етарских уља у смислу проналаска природног агенса који би имао потенцијал за детаљнија истраживања, као и могућу употребу као допунске или комбиноване терапије гениталних кандидоза. Етарска уља су изабрана на основу досадашњих података из литературе који су показали значајан антифунгални потенцијал уља цитруса, али с обзиром да постоји ограниченост у доступним публикованим научним подацима о анти-*Candida* ефикасности, узели смо у обзир испитивање етарских уља одабраних врста цитруса.

5.3.1. Хемијски састав етарских уља биљних врста *C. limon*, *C. aurantium*, *C. aurantifolia*, и *C. paradisi*

Методом GC/MS анализиран је хемијски састав одабраних етарских уља породице Rutaceae, а резултати су представљени у табели 17. У овом делу истраживања испитивана су четири комерцијално доступна етарска уља и то, врста: *C. limon* (лимон), *C. aurantium* (поморанца), *C. aurantifolia* (лимета) и *C. paradisi* (грејпфрут). Од детектованих површина пикова дентификовано је 92,2% у узорку уља лимуна, 45,8% у уљу лимете, 63,0% у узорку поморанце и 99,0% у уљу грејпфрута. Главни састојци етарског уља врсте *C. limon* били су лимонен са 29,7%, затим β -пинен са 11,0%, лимонен 1,2-диол са 6,2% и *trans*-лимонен-оксид са 5,7%. Најзаступљенији састојци уља врсте *C. aurantium* били су лимонен са 24,1%, затим лимонен 1,2-диол (6,8%) и карвон (5,6%). Уље врсте *C. aurantifolia* садржало је у највећем проценту лимонен 1,2-диол (10,2%), потом *p*-цимен-8-ол (4,4%), 4-хидрокси-4-метилциклохекс-2-енон (4,0%), α -терпинеол (3,7%) и карвон (3,3%). Доминантни састојци уља грејпфрута били су лимонен са 86,3% удела и β -мирцен са 2,6%.

На основу прегледа доступне литературе, издвојена су истраживања која су се бавила анализом хемијског састава етарских уља цитруса (Al-Aamri et al., 2018; Ammar et al., 2012; Badalamenti et al., 2022; Hojjati et al., 2016; Mohammed et al., 2024). У раду Ammar et al. (2012) одређен је хемијски састав етарског уља цвета биљне врсте *C. aurantium* узгајане на североистоку Туниса, при чему је утврђено присуство 33 састојака чиме је обухваћено 99% узорка. Главни састојци били су лимонен (27,5%), затим (*E*)-неролидол (17,5%), α -терпинеол (14,0%), α -терпинил-ацетат (11,7%) и (*E,E*)-фарнезол (8,0%). Поређењем анализираних узорка уља *C. aurantium* са нашим резултатима могу се уочити значајне разлике у идентификованим састојцима изузев доминантног једињења, лимонена, који је

био и процентуално слично заступљен (24,1%). Испитан је и хемијски састав етарских уља изолованих из листа, незреле и зреле коре врсте *C. aurantium* са југозапада Ирана. Уља незреле и зреле коре поморанџе имала су сличан процентуални садржај главног састојка, лимонена (59,9% и 81,6%), док су се остала заступљена једињења разликовала. Поред лимонена, уље незреле коре садржало је и *allo*-аромадендрен (5,9%), β -мирцен (3,9%) и *cis*-лимонен-оксид (3,6%). У уљу зреле коре био је присутан β -мирцен са 5,7% заступљености, као и линалоол са 2,2%, док су сва остала једињења била у значајно мањим количинама. Доминантни састојци уља листа поморанџе били су линалоол (32,6%), затим α -терпинеол (17,2%) и линалил-ацетат (13,3%) (Hojjati et al., 2016).

Badalamenti et al. (2022) су у свом раду приказали хемијске профиле седам етарских уља добијених из различитих сорти биљне врсте *C. aurantium* гајених у ботаничкој башти у Палерму, Сицилија. Утврдили су значајну варијабилност у хемијском саставу узорка сорте „*Crispifolia*“, где су главни састојци били лимонен (33,4%), затим геранил-ацетат (10,1%), линалоол (7,7%) и α -терпинеол (7,1%). Лимонен (33,4–89,2%) био је главни идентификовани монотерпенски угљоводоник, а α -пинен, β -мирцен и линалоол су уочени у скоро свим узорцима. Наша анализа узорка уља врсте *C. aurantium* показала је лимонен као главни угљоводоник, док су и лимонен-1,2-диол (6,8%) и карвон (5,6%) припадали процентуално доминантним састојцима.

Табела 17. Хемијски састав етарских уља одабраних врста породице Rutaceae

RI ^a	Састојак	Садржај (%) ^б				Метода идентификације ^в
		<i>C. limon</i>	<i>C. aurantium</i>	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. paradisi</i>	
952	α -Пинен	2,1	0,3	н.д. ^д	0,4	RI, MS, CoI
982	Сабинен	1,1	0,2	н.д.	0,4	RI, MS, CoI
987	β -Пинен	11,0	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
994	β -Мирцен	н.д.	н.д.	н.д.	2,6	RI, MS, CoI
1004	<i>n</i> -Октанал	н.д.	тр. ^г	н.д.	0,8	RI, MS, CoI
1018	1,4-Синеол	н.д.	н.д.	0,7	н.д.	RI, MS
1028	<i>p</i> -Цимен	1,1	н.д.	0,7	н.д.	RI, MS, CoI
1033	Лимонен	29,7	24,1	0,7	86,3	RI, MS, CoI
1034	1,8-Синеол	н.д.	н.д.	2,5	н.д.	RI, MS, CoI
1080	<i>p</i> -Крезол	н.д.	н.д.	0,2	н.д.	RI, MS, CoI
1094	<i>p</i> -Цименен	н.д.	н.д.	0,3	н.д.	RI, MS
1102	Линалоол	н.д.	0,5	0,2	0,6	RI, MS, CoI

1119	<i>endo</i> -Фенхол	н.д.	н.д.	0,6	н.д.	RI, MS, CoI
1125	<i>trans-p</i> -Мента-2,8-диен-1-ол	1,3	1,6	н.д.	н.д.	RI, MS
1128	4-Хидрокси-4-метилциклохекс-2-енон	н.д.	н.д.	4,0	н.д.	RI, MS
1141	<i>cis-p</i> -Мента-2,8-диен-1-ол	н.д.	3,3	1,5	н.д.	RI, MS
1138	<i>cis</i> - Лимонен-оксид	2,3	н.д.	н.д.	0,8	RI, MS, CoI
1144	<i>trans</i> -Лимонен-оксид	5,7	3,2	н.д.	0,8	RI, MS
1146	<i>trans</i> -Пинокарвеол	3,7	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1148	<i>cis-β</i> -Терпинеол	н.д.	1,3	1,4	н.д.	RI, MS
1163	Сабина-кетон	0,3	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
1167	<i>trans-β</i> -Терпинеол	н.д.	0,2	0,3	н.д.	RI, MS
1168	Пинокарвон	0,3	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1172	Борнеол	н.д.	н.д.	0,3	тр.	RI, MS, CoI
1187	Октанска киселина	н.д.	тр.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1190	<i>p</i> -Цимен-8-ол	0,1	н.д.	4,4	н.д.	RI, MS
1193	<i>trans-p</i> -Мента-1(7),8-диен-2-ол	0,6	1,0	н.д.	0,1	RI, MS
1196	α -Терпинеол	0,3	тр.	3,7	0,1	RI, MS, CoI
1203	Миртенол	3,7	н.д.	0,6	н.д.	RI, MS, CoI
1206	Деканал	н.д.	н.д.	н.д.	0,5	RI, MS, CoI
1225	<i>trans</i> -Карвеол	2,4	5,5	1,7	0,6	RI, MS
1227	2 α -Хидрокси-1,8-синеол	н.д.	н.д.	1,1	н.д.	RI, MS
1235	<i>cis</i> -Карвеол	1,8	3,2	1,2	0,5	RI, MS, CoI
1246	Нерал	0,3	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1247	О-Метилкарвакрол	н.д.	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS, CoI
1248	Карвон	2,3	5,6	3,3	0,7	RI, MS, CoI
1272	<i>cis</i> -Карвон-оксид	н.д.	0,1	н.д.	н.д.	RI, MS
1275	<i>trans-p</i> -Мента-2-ен-1,4-диол	н.д.	н.д.	2,0	н.д.	RI, MS
1275	Гераниал	0,7	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS, CoI
1277	Нонанска киселина	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1280	Изопиперитон	0,6	0,1	н.д.	н.д.	RI, MS
1282	Перила-алдехид	н.д.	1,0	н.д.	0,1	RI, MS, CoI
1283	Тимол	н.д.	н.д.	н.д.	1,4	RI, MS, CoI
1285	<i>trans</i> -Карвон-оксид	0,4	0,9	н.д.	н.д.	RI, MS
1295	Лимонен-10-ол	0,4	0,7	н.д.	н.д.	RI, MS
1303	Карвакрол	н.д.	н.д.	н.д.	1,0	RI, MS, CoI
1304	Лимонен-диоксид	1,2	3,3	1,7	н.д.	RI, MS
1305	2-Ундеканон	н.д.	н.д.	0,4	н.д.	RI, MS, CoI

1307	Перила-алкохол	1,2	0,1	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1346	Лимонен-1,2-диол *стереоизомер није одређен	6,2	6,8	10,3	н.д.	RI, MS
1356	Лимонен-1,2-диол *стереоизомер није одређен	0,6	н.д.	1,0	н.д.	RI, MS
1367	Нерил-ацетат	2,2	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1381	α -Копаен	н.д.	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS
1386	Геранил-ацетат	1,4	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1392	β -Бурбонен	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1396	β -Кубебен	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1400	Тетрадекан	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1410	Додеканал	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1426	<i>trans</i> -Кариофилен	н.д.	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS, CoI
1426	Сесквитујен	0,1	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
1436	β -Копаен	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1441	α - <i>trans</i> -Бергамотен	0,1	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
1460	α -Хумулен	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1501	Валенцен	0,4	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
1507	α -Муролен	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS
1512	β -Бисаболен	1,3	н.д.	0,5	0,7	RI, MS
1529	δ -Кадинен	н.д.	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS
1580	Кариофенил- алкохол	н.д.	н.д.	0,3	н.д.	RI, MS
1587	Спатуленол	0,2	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
1593	Кариофилен-оксид	0,6	н.д.	н.д.	0,1	RI, MS
1600	Хексадекан	тр.	н.д.	0,2	тр.	RI, MS, CoI
1680	(3Z)-Кариофила- 3,8(13)-диен-5 β -ол	0,1	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
1692	β -Бисаболол	0,1	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1734	Криптомерион	0,1	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
1748	β -Оплопанон	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
1817	Нооткатон	0,1	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
1800	Октадекан	н.д.	н.д.	н.д.	тр.	RI, MS, CoI
1962	Хексадеканска киселина	тр.	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS, CoI
1993	Цитраптен	0,2	н.д.	н.д.	н.д.	RI, MS
Укупно:		92,2	63,0	45,8	99,0	

^aЕкспериментално одређени ретенциони индекси на DB-5MS колони у односу на серију C₇-C₄₀ *n*-алкана. ^bСредње вредности три анализе. ^cRI – идентитет једињења потврђен поређењем ретенционих индекса; MS – идентитет једињења потврђен поређењем масених спектара; CoI - идентитет једињења потврђен експериментом ко-инјекције са стандардом. ^dтр, количине у траговима (< 0,05%).

^eн.д. – једињење није детектовано. *суп.* - синоним.

Mohammed et al. (2024) анализирали су хемијске профиле етарских уља коре грејпфрута (*C. paradisi*), лимете (*C. aurantifolia*) и поморанџе (*C. sinensis*). Као најзаступљеније једињење идентификован је лимонен у садржају од 91,5% код уља грејпфрута, затим 25,5% код уља лимете и 95,4% код уља поморанџе. Доминантни састојци етарског уља врсте *C. aurantifolia* били су и γ -терпинен (11,3%), затим гераниал (9,7%) и β -пинен (9,4%). Доминантна једињења састава уља врсте *C. paradisi* била су и β -мирцен (2,3%), *trans*-линалоол-оксид (1,5%) и изокариофилен (1,2%). Посматрањем састава нашег узорка уља *C. aurantifolia*, уочава се неподударност у добијеним подацима са литературом. Најзаступљенија једињења била су лимонен-1,2-диол (10,2%), потом *p*-цимен-8-ол (4,4%), 4-хидрокси-4-метилциклохекс-2-енон (4,0%). Хемијски профил уља грејпфрута био је у подударности са овим истраживањем. Узорак етарског уља врсте *C. aurantifolia* из 2015. године из источне регије Омана садржао је укупно 33 састојака, а доминантна једињења била су лимонен (63,4%), потом нерол (7,1%), гераниол (6,2%), гераниал (4,4%), нерал (3,3%) и β -оцимен (2,3%) (Al-Aamri et al., 2018).

5.3.2. Испитивање анти-*Candida* активности одабраних етарских уља

Антифунгална својства етарских уља испитана су микродилуционом методом на укупно једанаест сојева кандиде, од чега је један био референтни АТСС сој, а осталих десет клинички изолати. Како је приказано у табели 18, испитивана етарска уља (*C. limon*, *C. aurantium*, *C. paradisi* и *C. aurantifolia*) показала су одређени степен инхибиторне активности према тестираним сојевима. Минималне инхибиторне концентрације кретале су се у распону од 0,0097 до 10 mg/mL. Распон вредности за тестирана уља *C. limon* и *C. paradisi* кретао се од 0,312 до 10 mg/mL што их је чинило мање ефикасним у инхибицији раста изолата *Candida* у поређењу са уљем поморанџе и лимете. Уље поморанџе је показало најбољу активност при чему је најнижа МИК вредност од 0,009 mg/mL била примећена код изолата 5, док је код лимете она износила 0,156 mg/mL.

Прегледом литературе утврђено је да постоји ограничен број студија на тему утицаја етарских уља цитруса на анти-*Candida* активност, али њихови подаци указују на значајну инхибицију сојева *Candida* (Ailli et al., 2023; Ammar et al., 2012; Chintaluri et al., 2015; Costa et al., 2014; Gniewosz et al., 2017; Mancuso et al., 2019; Mohammed et al., 2024; Nidhi et al.,

2020). У раду Ammar et al. (2012) истражен је антимикуробни потенцијал етарског уља *C. aurantium* при чему је експериментом било обухваћено 6 бактеријских врста, 2 квасца и 3 врсте гљива. Методом диск-дифузије утврђен је значајан антибактеријски ефекат са приказаним зонама инхибиције у распону од 11 до 19 mm, док је антифунгална активност била значајно боља. Инхибиторне зоне око колонија квасаца *S. cerevisiae* и *C. albicans* након третмана уљем поморанџе биле су 20 и 22 mm, тим редоследом. Mancuso et al. (2019) испитивали су антимикуробну активност седам етарских уља цитруса, укључујући уље *C. aurantium*. Сви узорци етарских уља тестирани су на 18 бактеријских и 4 соја рода *Candida*. За процену антимикуробног потенцијала примењена је диск-дифузиона метода на агару, а као позитивна контрола коришћен је антимикуотик миконазол. Резултати су показали да су два хумана изолата *Candida* spp. била потпуно осетљива (100% редукције раста) на сва тестирана уља, док је код преостала два изолата уочена отпорност на терпене из етарског уља лимуна, а остала етарска уља показала су јаку или умерену антифунгалну активност.

У раду Nidhi et al. (2020), утврђено је да етарско уље горке поморанџе испољава антифунгалну активност која је упоредива или чак супериорна у односу на антимикуотике. Вредности минималних инхибиторних концентрација за уље поморанџе према изабраним референтним сојевима *C. albicans* кретале су се у распону од 0,0015 до 0,0031 mg/mL, што указује на већу ефикасност уља у поређењу са стандардним антимикуотцима као што су флуконазол и амфотерицин Б. Поред микродилуционе методе, примењена је и диск-дифузиона метода ради потврде резултата. Након 48 сати инкубације, зоне инхибиције изазване дејством уља поморанџе кретале су се између $25,3 \pm 0,47$ mm и $19 \pm 0,02$ mm. Насупрот томе, флуконазол и амфотерицин Б показали су мање зоне инхибиције, у опсегу од $18 \pm 0,2$ mm до $21 \pm 0,5$ mm.

Gniewosz et al. (2017) наводе да је етарско уље поморанџе испољило слабији антифунгални у поређењу са антибактеријским ефектом. Минималне инхибиторне концентрације за бактерије кретале су се у распону од 0,63 до 5 mg/mL, док су за гљиве износиле од 1,25 до чак 40 mg/mL. Најслабији ефекат уочен је код изолата *C. krusei*, при чему је забележена МИК вредност од 40 mg/mL, док је у нашем истраживању етарско уље поморанџе показало знатно јачу активност према изолатима *C. krusei*, где МИК вредности нису прелазиле 0,156 mg/mL, што указује на знатно већи антимикуотички потенцијал у

односу на објављене резултате у поменутој студији. Ailli et al. (2023) презентovali су резултате испитивања хемијског састава и антимикробног потенцијала неколико одабраних етарских уља биљака (*Laurus nobilis*, *Chamaemelum nobile*, *C. aurantium*, *Pistacia lentiscus*, *Cedrus atlantica*, *Rosa damascena*). Након анализе хемијског профила *C. aurantium* утврђене су доминантни састојци етарског уља који се процентуално значајно разликују од хемијског профила нашег комерцијалног узорка уља *C. aurantium*. Главни састојци били су линалоол (29,1%), затим 2*E*, 6*E* фарнезол (12,8%) и линалоол ацетат (12,4%), док је окарактерисани узорак нашег истраживања садржао лимонен као доминантно једињење са 24,1% и лимонен-1,2 диол са 6,8%. Анти-*Candida* активност била је уочљиво слабија (МИК вредности од 0,6 до 5,0 mg/mL) у односу на добијене податке наше студије, па се може претпоставити да за неподударност одговорна разлика у хемијском саставу узорака уља (МИК вредности од 0,009 до 0,156 mg/mL).

Истраживање Mohammed et al. (2024) обухватило је анализу хемијског састава етарских уља цитруса (*C. paradisi*, *C. aurantifolia* и *C. sinensis*) и тестирање антимикробног потенцијала применом диск дифузионе методе. Резултати су показали значајнију анти-*Candida* активност у односу на инхибиторни утицај на тестиране сојеве бактерија (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*). Зона инхибиције етарског уља *C. aurantifolia* на врсту *C. albicans* била је $17 \pm 1,75$ mm, док је за уље *C. sinensis* била $14 \pm 1,03$ mm па се може закључити да су тестирана уља показала умерену активност. Наши резултати истраживања анти-*Candida* потенцијала етарских уља *C. aurantifolia* и *C. aurantium* утврдили су знатно јачи инхибиторни ефекат на све тестиране гениталне клиничке изолате као и стандардни лабораторијски сој рода *Candida*. Ово се може објаснити другачијим хемијским саставом испитиваних уља цитруса, процентуалном заступљеношћу доминантних једињења, као и коришћеном методом која није довољно прецизна.

Costa et al. (2014) испитивали су антимикробно дејство етарског уља *C. aurantifolia* (лимете) на референтне сојеве *C. albicans* (ATCC 10231), *C. parapsilosis* (ATCC 2219), као и на клиничке изолате *C. albicans*, поред великог броја Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија. Истраживање је показало да етарско уље лимете испољава израженије антифунгално него антибактеријско дејство, а посебно је значајна његова активност против

C. albicans, где је за референтни сој забележена МИК од 0,00125 mg/mL. За клиничке изолате кандиде, МИК је варијала у распону од 0,000625 до 0,0025 mg/mL.

Табела 18. Минималне инхибиторне концентрације етарских уља одабраних одабраних биљних врста породице Rutaceae

Бр.	Изолати	<i>C. limon</i>	<i>C. aurantium</i>	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. paradisi</i>	Нистатин
		МИК (mg/mL)	МИК (mg/mL)	МИК (mg/mL)	МИК (mg/mL)	МИК (mg/mL)
1	<i>Candida krusei</i>	2,500	0,156	0,156	0,625	0,00312
2	<i>Candida albicans</i>	5,000	0,156	0,625	10,00	0,00625
3	<i>Candida albicans</i>	5,000	0,156	1,250	2,500	0,01250
4	<i>Candida krusei</i>	1,250	0,078	0,625	0,625	0,00625
5	<i>Candida albicans</i>	1,250	0,009	0,156	0,625	0,00625
6	<i>Candida krusei</i>	0,625	0,039	0,156	0,625	0,00625
7	<i>Candida albicans</i>	0,625	0,156	1,250	1,250	0,00625
8	<i>Candida krusei</i>	5,000	0,078	0,312	2,500	0,00312
9	<i>Candida albicans</i>	2,500	0,078	0,312	1,250	0,00312
10	<i>Candida albicans</i>	2,500	0,156	0,625	5,000	0,00625
11	<i>Candida krusei</i>	0,312	0,078	0,156	0,625	0,00312

МИК-Минимална инхибиторна концентрација; Анти-*Candida* активност=значајна (МИК<2 mg/mL); средња (МИК 2–4 mg/mL); слаба (МИК>4 mg/mL) (Ahmad et al., 2014)

У нашем истраживању, етарско уље лимете је такође показало снажно антифунгално дејство како на клиничке изолате, тако и на референтни сој *C. albicans* ATCC 24433. Остварене МИК вредности кретале су се у распону од 0,156 до 1,25 mg/mL. Chintaluri et al. (2015) испитивали су инхибиторну активност етарских уља поморанџе (*C. aurantium*) и лимете (*C. aurantifolia*) применом диск дифузионе методе. Тестирање је спроведено на 16 бактеријских сојева и једном соју квасца – *C. albicans*. Резултати су показали да оба етарска уља испољавају значајну антифунгалну активност, чак супериорну у односу на антимикотик кетоконазол, који је коришћен као позитивна контрола у овом истраживању.

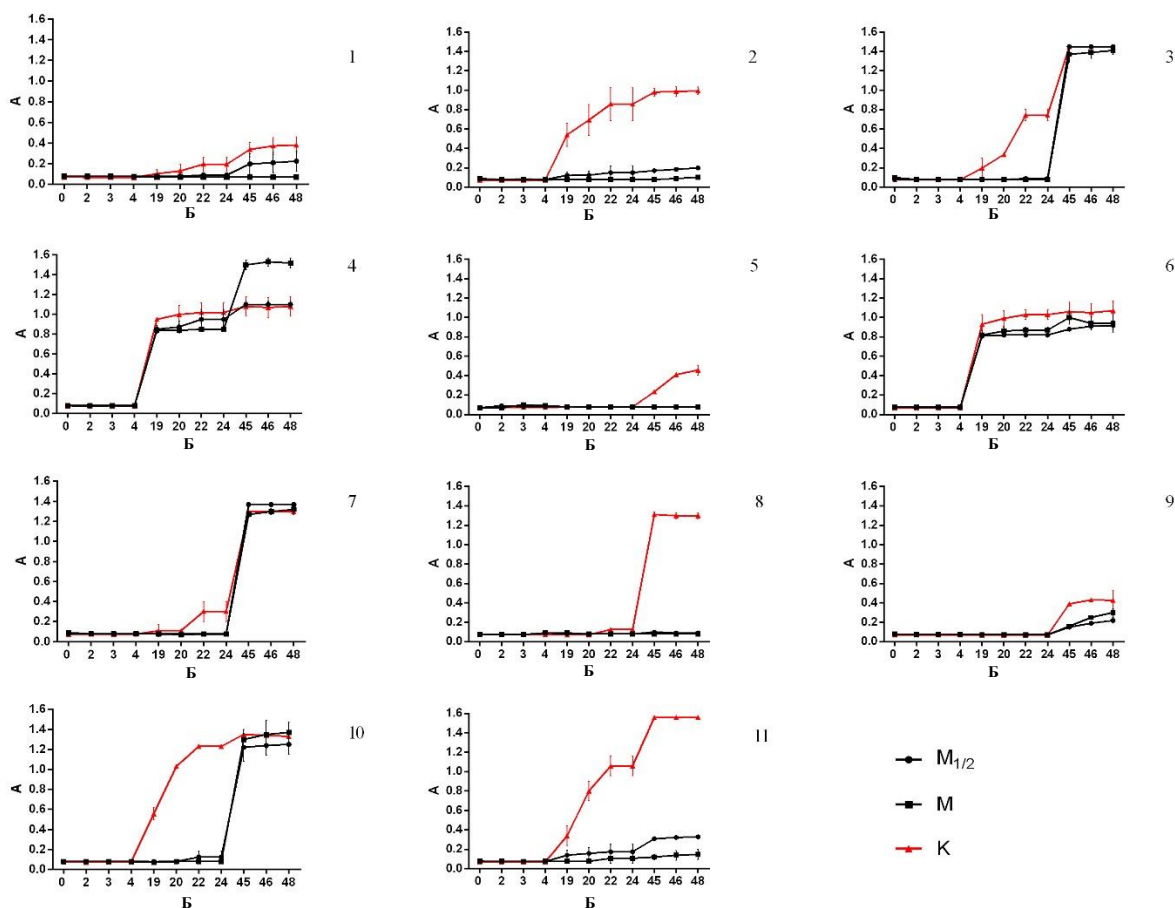
Зоне инхибиције које је изазвало уље *C. aurantium* кретале су се око $14,3 \pm 0,58$ mm, док је уље *C. aurantifolia* показало много ширу зону инхибиције – $36,7 \pm 0,58$ mm. За поређење, кетоконазол је изазвао зону инхибиције од $12,7 \pm 1,53$ mm, што додатно потврђује потенцијал етарских уља цитруса у борби против *C. albicans*.

Након анализе добијених резултата нашег истраживања може се закључити да сва четири испитивана етарска уља, која су представници породице Rutaceae, имају сличне хемијске профиле, изузев уља лимете. Испитивањем њихове анти-*Candida* активности утврђене су веома сличне концентрације при којима је био инхибиран раст планктонских ћелија што нас је даље навело да у наставку експерименталног тестирања уврстимо два од четири хемијски окарактерисана узорка уља. Етарска уља *C. aurantium* и *C. aurantifolia* одабрана су због значајних инхибиторних концентрација које су добијене микродилуционом методом, као због различитог хемијског састава уља лимете у односу на литературне податке. С обзиром на ограничен број података о инхибиторној активности етарских уља цитруса на вулвовагиналне изолате *Candida* који се генерално могу наћи у литератури, наше истраживање представља значајну основу за даља, много детаљнија испитивања њихове потенцијалне употребе у клиничке сврхе.

5.3.3. Праћење анти-*Candida* активности етарских уља током времена

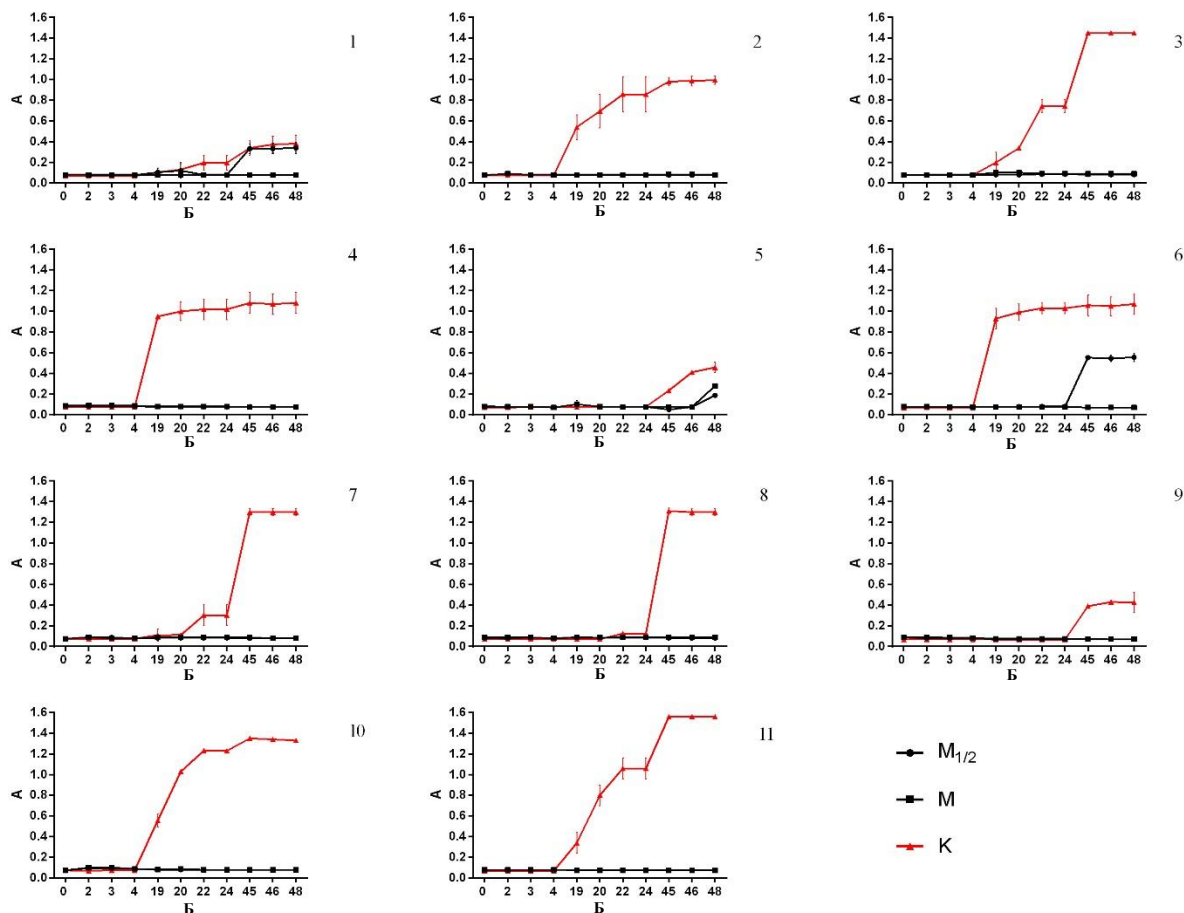
Реализовани експерименти обухватили су процену инхибиторне активности етарских уља *C. aurantium* и *C. aurantifolia* на изолате кандиди и референтног соја *C. albicans* ATCC 24433, обухватајући МИК и $\frac{1}{2}$ МИК вредности током времена. Прикупљени подаци су затим подвргнути статистичкој анализи и графички приказани (слика 22 и 23). Тестирањем етарског уља врсте *C. aurantium*, при концентрацији МИК, утврђена је висока ефикасност (фунгицидни ефекат) код 36,4% од укупног броја тестираних изолата (слика 22). Током првих 24 сата инкубације, код изолата 1, 3, 7, 9 и 10 утврђена је потпуна инхибиција а након тога примећен је опоравак културе и пораст броја ћелија. Уље је такође било ефикасно при $\frac{1}{2}$ МИК, значајно инхибирајући раст ћелија код 54,5% од укупног броја тестираних изолата. Највеће смањење броја ћелија популација уочено је код изолата 2 и 11, при чему је редукција ћелија износила 79,9% и 78,9%. Најосетљивији изолати на третман

обеа концентрацијама уља поморанџе били су изолати 5 и 8, где је примећен фунгицидни ефекат током свих 48 сати праћења бројности популације.



Слика 22. Праћење анти-*Candida* активности етарског уља врсте *C. aurantium* током времена. Статистичка анализа – двофакторска ANOVA са *Tukey post hoc* тестом, $p < 0,05$. $M_{1/2}$ – $\frac{1}{2}$ МИК; М – МИК; К – контрола; А – апсорбанца; Б – временски период.

Тестирањем етарског уља *C. aurantifolia*, при концентрацији МИК, утврђена је висока ефикасност (фунгицидни ефекат) код 90,9% од укупног броја тестираних изолата (слика 23). Уље је такође било ефикасно при $\frac{1}{2}$ МИК, значајно инхибирајући раст ћелија код 72,7% од укупног броја изолата при чему је редукција ћелија била потпуна током целог инкубационог периода. Занимљиво је да је инхибиција раста планктонских форми *Candida* била значајно боља након третмана уљем лимете, и то при обе концентрације.



Слика 23. Праћење анти-*Candida* активности етарског уља врсте *C. aurantifolia* током времена. Статистичка анализа – двофакторска ANOVA са *Tukey post hoc* тестом, $p < 0,05$. $M_{1/2}$ – $\frac{1}{2}$ МИК; М – МИК; К – контрола; А – апсорбанца; Б – временски период.

Подаци из литературе утврдили су активност етарских уља добијених из биљака породице Rutaceae или њихових главних састојака, показујући анти-*Candida* ефикасност у различитим временским периодима и при различитим концентрацијама (Ahmedi et al., 2022; Pedroso et al., 2019). Истраживачи Pedroso et al. (2019) презентовали су резултате испитивања инхибиторног деловања етарских уља *Litsea cubeba*, *C. limon* и *Cupressus sempervirens* на различите врсте рода *Candida*. Податке су представили у виду крива раста, при чему је етарско уље лимуна у концентрацији 125 $\mu\text{g/mL}$ и 250 $\mu\text{g/mL}$ испољило фунгицидни ефекат након третмана у трајању од 4 сата. Концентрација од 500 $\mu\text{g/mL}$ уља *C. limon* имала је поменути ефекат на врсте *C. tropicalis* и *C. glabrata* након 2 сата од започетог третмана. У нашем раду, испитивано уље врсте *C. aurantifolia* показало је

фунгицидни ефекат током целог периода третмана (48 сати) код већине тестираних изолата кандида при МИК дозама (слика 23). У случају уља врсте *C. aurantium* фунгицидни ефекат је постигнут код трећине од укупног броја тестираних изолата током свих 48 сати третмана при МИК дози. Можемо закључити да су испитивана уља поморанџе и лимете показала значајан фунгистатски/фунгицидни ефекат након третмана МИК и ½ МИК дозама у зависности од тестираног соја кандиде.

Ahmedi et al. (2022) испитивали су ефикасност деловања монотерпена лимонена на факторе вируленције врсте *C. albicans*. Графички је приказано праћење раста ћелија *C. albicans* ATCC 90028 током времена при различитим концентрацијама лимонена. Након 9 сати инкубационог периода, утврђено је да МИК вредност лимонена значајно смањује раст, док је двострука МИК вредност изазвала фунгицидни ефекат на планктонске ћелије *Candida*. Лимонен представља доминантни састојак наших узорака етарских уља врсте *C. aurantium* и врсте *C. aurantifolia*, стога можемо уочити да су поменута уља показала бољу инхибиторну активност на раст бројности популације кандида у односу на појединачно једињење.

5.3.4. Тип интеракције уља комбинованих са нистатином/другим уљима

Наставак истраживања анти-*Candida* активности етарских уља цитруса био је у смеру анализирања типова интеракције између комерцијалног антимикотика нистатина и етарских уља лимете и поморанџе, као и њихове међусобне интеракције. Циљ ове анализе био је идентификација ефикаснијих комбинација за терапију гениталних инфекција изазваних врстама рода *Candida*, с обзиром на све већу резистенцију ових микроорганизама на доступне антимикробне агенсе.

У истраживању је утврђено да су све испитиване комбинације етарских уља са нистатином показале синергистички или адитивни тип интеракције. Ни у једном случају није уочен антагонистички ефекат, што представља значајан податак и указује на потенцијалну корист комбиноване примене. Испитивања су спроведена на четири клиничка изолата (означена бројевима 2, 4, 5 и 6) и на једном референтном соју *C. albicans* ATCC 24433. Изолати 2 и 5 припадају врсти *C. albicans* (табела 19), док су изолати 4 и 6 идентификовани као *C. krusei* (табели 20). Фракциони инхибиторни концентрациони индекс

кретао се у распону од 0,312 до 1,00 што потврђује висок потенцијал етарских уља поморанце и лимете као допунских средстава у побољшању ефикасности антимикотичке терапије.

Табела 19. Синергистички потенцијал комбинованих етарских уља, као и њихове појединачне комбинације са нистатином, на клиничке изолате врсте *C. albicans* и референтног соја АТСС 24433

Комбинације	<i>Candida albicans</i> АТСС 24433			<i>Candida albicans</i> 2			<i>Candida albicans</i> 5		
	МИК _п	МИК _к	ФИК	МИК _п	МИК _к	ФИК	МИК _п	МИК _к	ФИК
1 <u>Ca/Cl</u>									
<i>C. aurantium</i>	0,156	0,039	0,25	0,156	0,078	0,50	0,009	0,0045	0,50
<i>C. aurantifolia</i>	1,250	0,312	0,25	0,625	0,156	0,25	0,156	0,078	0,50
*ФИКИ			0,50			0,75			1,00
Интеракција			С			А			А
2 <u>Ca/NY</u>									
<i>C. aurantium</i>	0,156	0,078	0,50	0,156	0,078	0,5	0,009	0,0011	0,12
Нистатин	0,006	0,003	0,50	0,006	0,0015	0,25	0,006	0,0015	0,25
*ФИКИ			1,00			0,75			0,37
Интеракција			А			А			С
3 <u>Cl/NY</u>									
<i>C. aurantifolia</i>	1,250	0,625	0,50	0,625	0,156	0,25	0,156	0,039	0,25
Нистатин	0,006	0,0015	0,25	0,006	0,003	0,75	0,006	0,0015	0,25
*ФИКИ			0,75			0,75			0,50
Интеракција			А			А			С

МИК_п-минимална инхибиторна концентрација појединачно (mg/mL); МИК_к-минимална инхибиторна концентрација у комбинацији (mg/mL); ФИК-фракциона инхибиторна концентрација; ФИКИ-фракциони инхибиторни концентрациони индекс. *Ca/Cl* – *C. aurantium/C. aurantifolia*; *Cl/NY* – *C. aurantifolia*/Нистатин; *Ca/NY* – *C. aurantium*/Нистатин. С – синергизам; А – адитивни ефекат; Ант. – антагонизам. *ФИКИ је тумачен као синергистички ефекат када је $\leq 0,5$, као адитивни или индиферентан када је $> 0,5$ и ≤ 2 , и као антагонистички када је његова вредност > 2 .

Табела 20. Синергистички потенцијал комбинованих етарских уља, као и њихове појединачне комбинације са нистатином, на клиничке изолате врсте *C. krusei* и референтног соја ATCC 24433

Комбинације	<i>Candida albicans</i> ATCC 24433			<i>Candida krusei</i> 4			<i>Candida krusei</i> 6		
	МИК _п	МИК _к	ФИК	МИК _п	МИК _к	ФИК	МИК _п	МИК _к	ФИК
1 <u>Ca/Cl</u>									
<i>C. aurantium</i>	0,156	0,039	0,25	0,078	0,0195	0,25	0,039	0,0195	0,5
<i>C. aurantifolia</i>	1,250	0,312	0,25	0,625	0,156	0,25	0,156	0,078	0,5
*ФИКИ Интеракција			0,50 С			0,50 С			1,00 А
2 <u>Ca/NY</u>									
<i>C. aurantium</i>	0,156	0,078	0,50	0,078	0,0195	0,25	0,039	0,039	0,50
Нистатин	0,006	0,003	0,50	0,006	0,0007	0,125	0,006	0,003	0,50
*ФИКИ Интеракција			1,00 А			0,375 С			1,00 А
3 <u>Cl/NY</u>									
<i>C. aurantifolia</i>	1,250	0,625	0,50	0,625	0,156	0,250	0,156	0,039	0,25
Нистатин	0,006	0,0015	0,25	0,006	0,00037	0,062	0,006	0,003	0,50
*ФИКИ Интеракција			0,75 А			0,312 С			0,75 А

МИК_п-минимална инхибиторна концентрација појединачно (mg/mL); МИК_к-минимална инхибиторна концентрација у комбинацији (mg/mL); ФИК-фракциона инхибиторна концентрација; ФИКИ-фракциони инхибиторни концентрациони индекс. *Ca/Cl* – *C. aurantium/C. aurantifolia*; *Cl/NY* – *C. aurantifolia*/Нистатин; *Ca/NY* – *C. aurantium*/Нистатин. С – синергизам; А – адитивни ефекат; Ант. – антагонизам. *ФИКИ је тумачен као синергистички ефекат када је $\leq 0,5$, као адитивни или индиферентан када је $> 0,5$ и ≤ 2 , и као антагонистички када је његова вредност > 2 .

У литератури постоји мали број објављених података о испитивању типова интеракције етарских уља цитруса на сојеве рода *Candida*. У једном новијем раду Nidhi et al. (2020) испитиван је синергистички потенцијал етарског уља *C. aurantium* у комбинацији са антимицотицима флуконазолом и амфотерицином Б, у односу на два референтна соја *C. albicans* (Nidhi et al., 2020). Слично резултатима нашег истраживања, етарско уље поморанџе у комбинацији са тестираним агенсима показало је снажан синергистички

ефекат. Индекс фракционе инхибиторне концентрације у њиховом раду кретао се у распону од 0,009 до 0,16 док су у нашем истраживању добијене вредности износиле 0,372 за *C. albicans* и 0,375 за *C. krusei*. Синергизам је потврђен и значајним смањењем МИК вредности применом комбиноване терапије: амфотерицин Б је показао смањење од 16 до 34 пута, флуконазол до 8 пута, док је у нашем раду МИК вредност нистатина била смањена од 4 до 8 пута. Ова разлика у резултатима највероватније потиче из различитог хемијског састава испитиваних уља, као и различитих антимикотика коришћених за процену интеракције.

Поред тога, у нашој студији испитиван је и синергистички ефекат етарског уља лимете са нистатином, где је уочено да ово уље може смањити МИК вредност нистатина чак од 4 до 16 пута, што додатно потврђује њихов синергистички потенцијал. На основу добијених резултата, закључујемо да је третман врсте *C. albicans* нистатином у комбинацији са етарским уљем лимете и/или поморанџе довео је до значајног смањења МИК вредности у поређењу са појединачним МИК ових супстанци. Претпоставља се да редукцијом дозе лека током третмана кандидоза можемо утицати на смањење токсичног ефекта, развоја резистенције на комерцијална средства услед дуготрајне употребе, као и могућности наставка употребе природних производа у циљу спречавања појаве рекурентних инфекција кандидом. Сличан ефекат уочен је и код третмана врсте *C. krusei* - у комбинацији са етарским уљем поморанџе МИК вредност нистатина је снижена са 6 на 0,7 µg/mL (8 пута), док је у комбинацији са уљем лимете смањена чак на 0,37 µg/mL (16 пута).

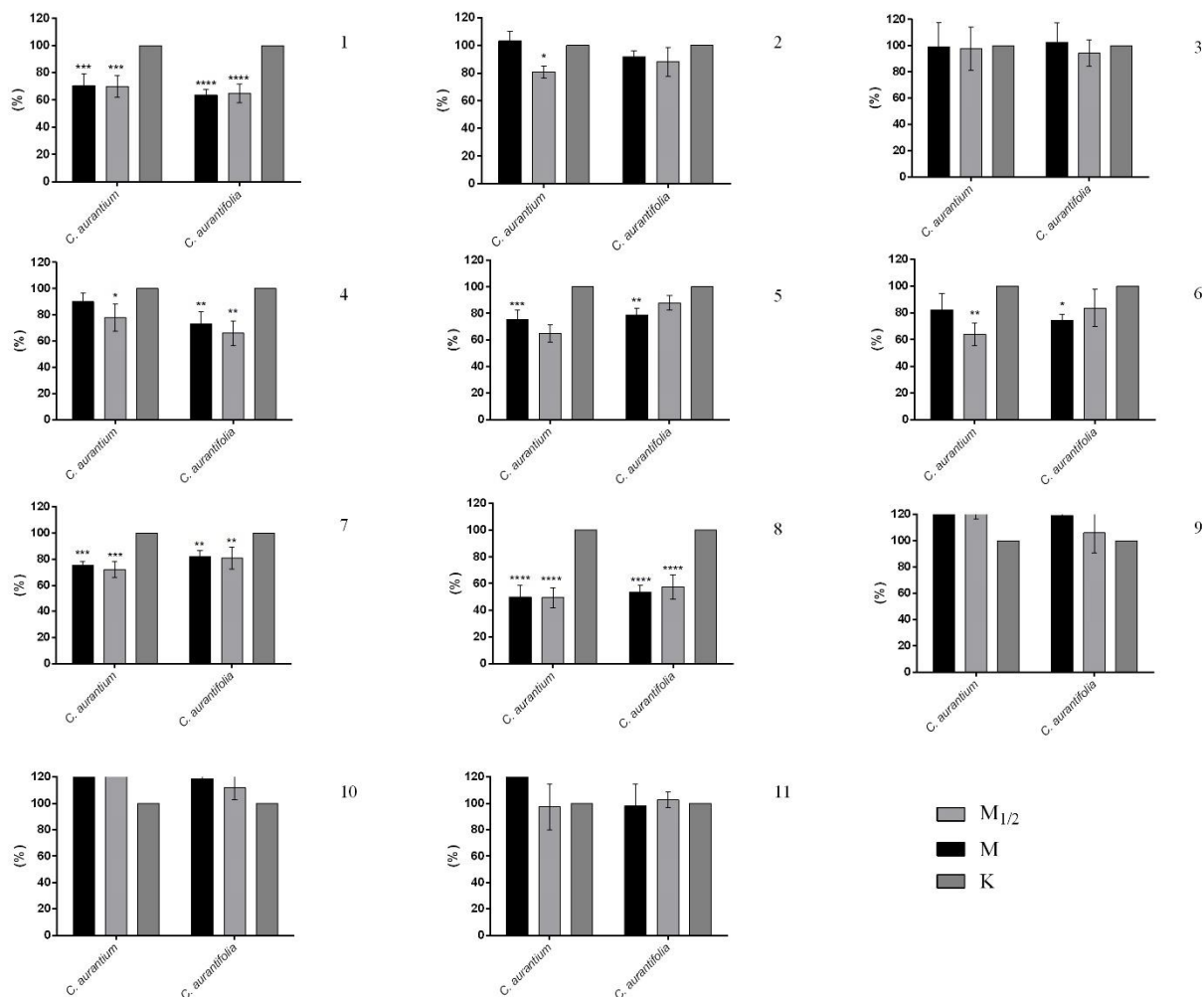
5.3.5. Антивирулентни ефекат

Циљ друге етапе нашег истраживања био је испитивање инхибиторне способности етарских уља *C. aurantium* и *C. aurantifolia* на продукцију биофилмова вулвовагиналних клиничких изолата *Candida*. Из приложених графикана јасно се може закључити да етарска уља *C. aurantium* и *C. aurantifolia* испољавају умерен до значајан инхибиторни ефекат на формирање биофилмова код изолата врста *C. albicans* и *C. krusei* (слика 24). Обе тестиране концентрације етарског уља *C. aurantium* значајно су редуковале способност формирања биофилма у случају изолата 8 при чему је редукција износила 49,9% при МИК а 50,6% при ½ МИК дози. Испитивањем способности формирања биофилма проценили смо и потенцијал етарског уља *C. aurantifolia* при чему је значајна редукција примећена код два

изолата. Највеће смањење од 42,6% на $\frac{1}{2}$ МИК и 46,5% на МИК уочено је у случају клиничког изолата 8 што имплицира да је био најосетљивији на третман уљем лимете. Обе тестиране концентрације значајно су редуковале способност формирања биофилма и у случају изолата 1 при чему је редукција износила 36,3% на МИК а 35,1% на $\frac{1}{2}$ МИК дози. Посебно је важно истаћи да су концентрације уља једнаке половини минималне инхибиторне концентрације показале готово исту ефикасност у редукцији биофилма као и саме МИК вредности. Овај податак указује на то да не постоји јасна концентрациона зависност у дејству тестираних етарских уља цитруса на биофилмове.

Прегледом литературе утврдили смо постојање неколицине радова на тему утицаја етарских уља цитруса на продукцију биофилмова рода *Candida* (Ahmedi et al., 2022; Oliveira et al., 2013; Pedroso et al., 2019; Taweechaisuparong et al., 2012). У студији коју су спровели Oliveira et al. (2013), испитиван је утицај етарских уља *C. limon* и *C. aurantium* на формирање и редукцију биофилмова код врста *C. albicans*, *E. faecalis* и референтних сојева *E. coli*. Резултати су показали да је тестирано етарско уље поморанце показало боље дејство с обзиром да је инхибирано продукцију биофилмова свих тестираних микроорганизама. Приказани подаци указују да је етарско уље *C. aurantium* имало више него дупло бољи ефекат у редукцији биофилма *C. albicans* у односу на резултате добијене у нашем истраживању. Разлог неподударања може се приписати разликама у хемијском саставу и процентуалном учешћу активних састојака етарских уља, као и различитом капацитету формирања биофилмова код коришћених сојева квасаца *Candida*.

Taweechaisuparong et al. (2012) истраживали су антибиофилм ефекат етарског уља лимунске траве при чему су добијени резултати указали на значајан редукциони потенцијал поменутог агенса на биофилм форме врсте *C. albicans* (16,0-41,0%) и *C. krusei* (46,0-79,0%). Pedroso et al. (2019) представили су резултате утицаја одабраних етарских уља (*L. cubeba*, *C. limon* и *C. sempervirens*) на планктонске и биофилм ћелије сојева *Candida* spp. Подаци су презентовани у виду минималних концентрација које инхибирају биофилм и минималних концентрација која га потпуно уништавају. Минималне инхибиторне концентрације етарског уља врсте *C. limon* кретале су се у распону од 125 $\mu\text{g/mL}$ до 2000 $\mu\text{g/mL}$ у зависности од врсте *Candida*, док су концентрације потребне за фунгицидно деловање биле од 1000 до 2000 $\mu\text{g/mL}$.



Слика 24. Антибиофилм активност етарских уља *C. aurantium* и *C. aurantifolia* на изолате рода *Candida*. Статистичка анализа – двофакторска ANOVA са Tukey post hoc тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ у односу на контролу. M_{1/2} – ½ МИК; М – МИК; К – контрола.

Студија Ahmed et al. (2022) приказала је биолошки потенцијал монотерпена лимонена на вирулентну активност врсте *C. albicans*. Приметили су да је испитивано једињење имало веома значајан ефекат у смањењу адхезије и формирања биофилмова у поређењу са нетретираним контролама. Процес формирања биофилмова је инхибиран при концентрацијама МИК/8, МИК/4, МИК/2 и МИК за 25,00%, 46,00%, 71,00% и 87,00%, тим редоследом. У нашем раду, дејством уља *C. aurantium* највећи проценат редукције формирања био је 49,9% при МИК а 50,6% при ½ МИК дози, док је дејством уља *C.*

aurantifolia редукциона способност износила 42,6% при $\frac{1}{2}$ МИК и 46,5% при МИК. Лимонен представља доминантно једињење хемијских профила већине врсти припадника рода *Citrus* па постоји основа за поређење анти-*Candida* активности испитиваних узорака етарских уља.

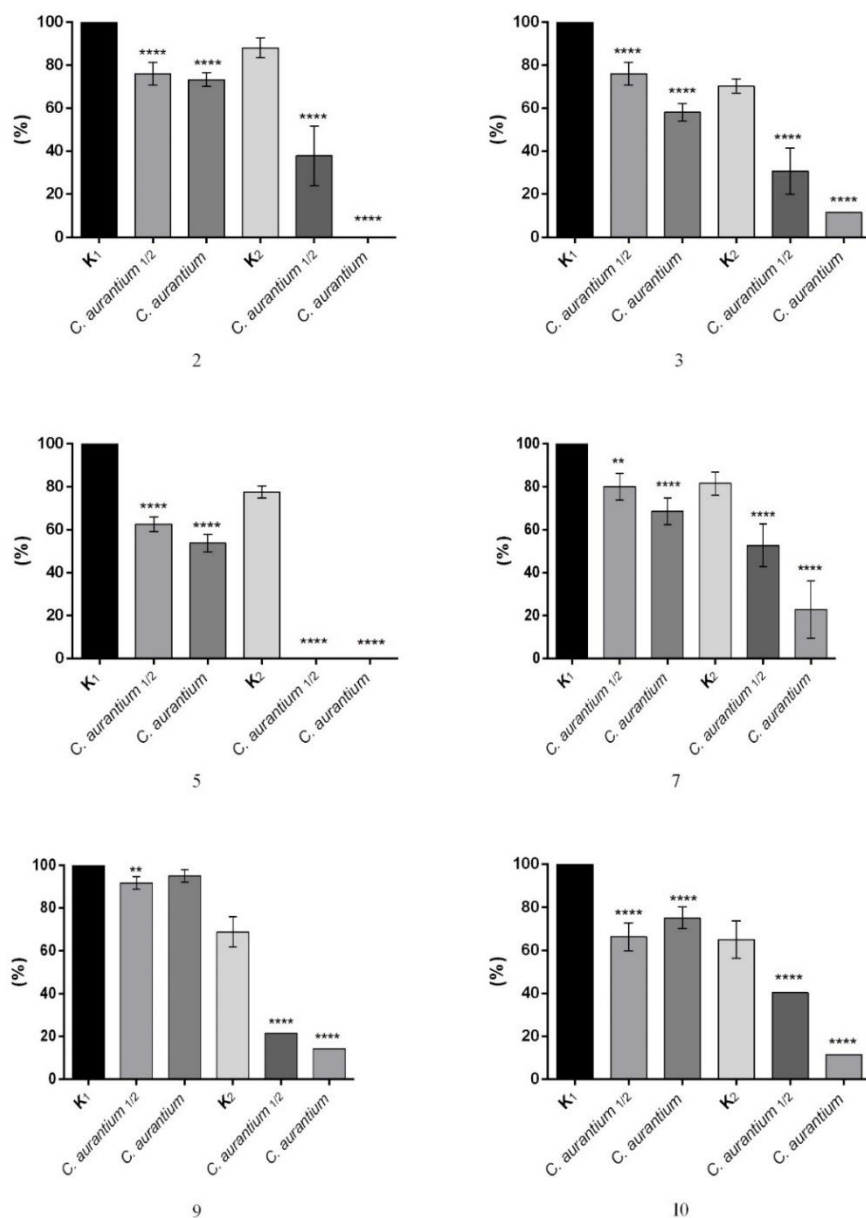
5.3.5.1. Активност етарског уља врсте *C. aurantium* L. на герминацију врсте *C. albicans* и продукцију ензима фосфолипазе

Етарско уље врсте *C. aurantium* показало је најистакнутији и најзначајнији ефекат инхибирања другог сета гениталних хуманих изолата. С обзиром на то, спроведен је и додатни тест његовог утицаја на важан фактор вируленције *Candida* - способност герминације сојева *C. albicans*.

У овој студији испитивана је могућност продукције герминационих цеви клиничких изолата вулвовагиналних *C. albicans* и референтног соја *C. albicans* ATCC 24433, као и антивирулентна активност етарског уља *C. aurantium* у концентрацијама МИК и $\frac{1}{2}$ МИК. У односу на контролну групу (K_1) утврђена је редукција укупног броја ћелија применом МИК и $\frac{1}{2}$ МИК дозе при чему је код 66,7% испитиваних изолата било утврђено статистички значајно смањење ($p < 0,0001$). Највеће смањење броја планктонских ћелија уочено је применом обе концентрације уља у случају изолата 5 при чему је редукција износила 46,3% на МИК и 37,5% на $\frac{1}{2}$ МИК вредности уља поморанце.

Резултати истраживања показали су потпуну инхибицију (100%) продукције герминационих цеви испитиваног изолата *C. albicans* (изолат 5), што је постигнуто применом обе концентрације етарског уља *C. aurantium*. Инхибиција герминације била је значајно примећена и третирањем осталих клиничких изолата *Candida*, при чему су МИК дозе уља поморанце показале бољи ефекат у односу на дупло мању концентрацију агенса.

■ K₁ ■ *C. aurantium* 1/2 ■ *C. aurantium* ■ K₂ ■ *C. aurantium* 1/2 ■ *C. aurantium*



Слика 25. Антивирулентна активност етарског уља *C. aurantium* на герминацију изолата врсте *C. albicans*. Статистичка анализа – једнофакторска ANOVA са Tukey post hoc тестом **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ у односу на контролу (K₁, K₂). K₁ – укупан број свих ћелија; K₂ – укупан број ћелија са герминационим цевима; *C. aurantium* 1/2 – 1/2 МИК; *C. aurantium* – МИК.

Способност герминације *C. albicans* (изолат 2) била је потпуно заустављена (100%) применом МИК вредности етарског уља, док је значајна редукција од 62,2% примећена применом $\frac{1}{2}$ МИК дозе. Узимајући у обзир резултате укупног броја свих ћелија у третираној и контролној групи, као и броја ћелија које су продуценти герминационих цеви, може се уочити значајна редукциона способност испитиваног узорка уља *C. aurantium* (слика 25).

Претрагом литературе нисмо дошли до доступних података о испитивању уља поморанце на герминацију сојева *C. albicans*, стога ће у наставку бити наведене студије о утицају других етарских уља биљака или њихових доминантних састојака на редукцију/инхибицију формирања герминационих цеви (Ahmedi et al., 2022; Leite-Andrade et al., 2022; Váczi et al., 2024). Váczi et al. (2024) су испитивали ефекат етарског уља и екстракта врсте *O. vulgare* на способност редукције герминационих цеви изолата врсте *C. albicans*. Узорак етарског уља показао је значајну активност при чему је успешно редуковано 100% герминационих цеви испитиваних изолата. Екстракт оригана имао је слабији ефекат и зависио је од примењене концентрације па се распон редукције кретао од 2,6% до 64,5%, у односу на контролну групу.

Истраживачи Ahmedi et al. (2022) презентовали су резултате студије о утицају монотерпена лимонена на факторе вируленције врсте *C. albicans*, обухватајући и испитивање његовог утицаја на овај фактор патогенезе кандиди. Користили су четири различите подлоге за тестирање способности герминације одабраних сојева, при чему су употребили МИК вредности лимонена за третман групу. Након периода инкубације на 37 °C, нетретиране контролне групе имале су значајно повећан раст и филаментацију квасаца, док је третирана група била инхибирана од стране тест супстанце при минималној инхибиторној концентрацији. Leite-Andrade et al. (2022) су у свом истраживању представили процену способности формирања герминационих цеви код 40 изолата врсте *C. parapsilopsis*. Герминациона способност била је својствена сваком специфичном изолату, а након третмана монотерпенским једињењем лимоненом утврђена је инхибиција или потпуно заустављање продукције овог вирулентног фактора. Вредности редукције броја цеви кретале су се од 18,0 до 100 % у зависности од испитиваног изолата *Candida*. Упоређујући са нашим подацима испитивања дејства уља *C. aurantium* на клиничке изолате

врсте *C. albicans* може се закључити да уља цитруса, чији је један од доминантних састојака био лимонен, имају подједнако значајан ефекат на редукцију герминације кандиди.

Фосфолипазна активност сојева *Candida* spp. у контролној и третираној групи изражена је као P_3 вредност зоне продукције (Price et al., 1982). Експеримент је трајао 6 дана, међутим, анализом добијених података наше студије није утврђен позитиван ефекат с обзиром да је P_3 вредност била 1,00 изолати су дефинисани као не – продукујући сојеви (табела 21).

Табела 21. Продукција ензима фосфолипазе вулвовагиналних изолата

Изолати	2 дана	6 дана
	Контрола	Контрола
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-

-: није продуцент ($P_3=1$); (Mohandas & Ballal, 2011)

Резултати испитивања способности продукције ензима фосфолипазе вулвовагиналних клиничких сојева *Candida* показали су да ниједан од тестираних изолата није био фосфолипазни продуцент. С обзиром на поменуто чињеницу, најактивније етарско уље поморанце које је планом истраживања требало бити подвргнуто овом тесту није употребљено. Важност испитивања клиничких сојева су нагласили истраживачи Mohandas & Ballal (2011) који су тестирали способност продукције фактора вируленције 111 клиничких изолата *Candida* из различитих инфекција, укључујући и способност продукције фосфолипазе. Установили су фосфолипазну активност код 44,1% од укупног броја тестираних изолата укључујући различите врсте кандиди, и то: 49 изолата *C. albicans*, 7 изолата *C. glabrata*, 4 изолата *C. guilliermondi*, 2 изолата *C. kefyr*, 35 изолата *C. krusei*, 5 изолата *C. parapsilosis* и 9 изолата *C. tropicalis*. Истраживање које су спровели Shirkhani et al. (2016) обухватило је испитивање 82 клиничка вулвовагинална изолата (врсте *C.*

albicans, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. colliculosa*, *C. parapsilopsis*, *C. intermedia*, *C. famata*, *C. mundia* и *C. glabrata*) при чему већина није било позитивно на ензим фосфолипазе. У случају врсте *C. albicans* 70,6% од укупно тестираних изолата били су негативни на продукцију фосфолипазе, док је сличан резултат уочен и код врсте *C. krusei* са 66,7% не-продукујућих сојева (Shirkhani et al., 2016). У једној од новијих студија (Mello et al., 2021), испитано је 45 клиничких изолата *Candida* који су узорковани из дерматомикоза, при чему је утврђено да њих 32 нису били продуценти ензима фосфолипазе што представља 72,1% од укупно тестираних.

На основу претходно утврђених подата о не-продукујућим сојевима кандиди, као и резултата нашег истраживања, можемо указати на значајност испитивања управо клиничких изолата микроорганизама, пре свега због њихове варијабилности у односу на порекло и могућности изоловања из различитог хуманог материјала. Сваки од изолата може имати особине које се разликују од уобичајених па тако имати потенцијално већу/мању способност резистенције на антимикробне агенсе. Како сваки организам поседује микробиом који је јединственог састава, тако и сваки изоловани узорак бактерије или гљиве може имати своје специфичности. Поред испитивања референтних лабораторијских сојева бактерија и гљива, научна истраживања треба више базирати на утврђивању ефекта потенцијалних антимикробних агенаса на раст и факторе вируленције хуманих клиничких изолата узоркованих из различитих инфекција.

Ограничења истраживања:

Ова докторска дисертација има одређена ограничења која је потребно узети у обзир. Најпре, коришћење етарских уља у истраживањима, а посебно комерцијалних, може давати различите резултате при каснијем испитивању истих због постојања одређене варијабилности у хемијском саставу између произведених серија. Такође, и у случају биљног материјала истог порекла (иста врста), могуће су разлике у хемијском саставу јер на њега могу утицати разни фактори укључујући локалитет, надморску висину, климатске параметре, фенолошку фазу у којој је материјал сакупљан, као и методе и параметре током екстракције уља. Стога, стандардизација састава и дозирања етарског уља представља кључни корак како би се обезбедила поузданост, репродуктивност и ефикасност у потенцијалној клиничкој употреби. Поред тога, коришћен је релативно мали број клиничких изолата рода *Candida*, па се предлажу будућа истраживања која би свеобухватније сагледала антифунгалну активност укључујући и већи број изолата. Резултати су указали на активност специфичну за сој, па се предлажу и молекуларне анализе којима би се утврдиле разлике у експресији одређених гена изолата који су показали већу сензитивност/резистенцију. Иако су добијени *in vitro* резултати охрабрујући, важно је нагласити да изостанак *in vivo* испитивања умањује директну клиничку применљивост добијених резултата. Стога је, уз проширена *in vitro* испитивања, неопходно је спровести и свеобухватне *in vivo* студије како би се потврдила терапијска ефикасност и безбедност анализираних етарских уља за потенцијалну примену у лечењу кандидоза.

6. ЗАКЉУЧАК

Ова докторска дисертација представља скрининг анти-*Candida* активности етарских уља одабраних биљних врста породица Lamiaceae, Asteraceae и Rutaceae.

Истраживање је утврдило значајан анти-*Candida* ефекат тестираних етарских уља одабраних биљних врста породице Lamiaceae (*S. montana*, *T. vulgaris* и *O. vulgare*). Анализом хемијског састава три етарска уља, идентификовано је укупно 118 једињења. Главни састојци били су тимол, карвакрол и *p*-цимен. Методом микродилуције утврђен је значајан инхибиторни ефекат сва три уља на планктонске ћелије *Candida*, при чему је најактивније од њих било уље оригана са МИК вредностима од 0,312 до 0,625 mg/mL. Применом МИК дозе, фунгицидни ефекат утврђен је код 60,6% свих испитиваних третмана. Поред тога, уља су испитана на потенцијалне синергистичке интеракције како међусобно, тако и са нистатином, а резултати су указали на синергистички ефекат у 72,2% комбинација, док су остале имале адитиван ефекат. Антибиофилм активност сва три уља при концентрацијама МИК и ½ МИК кретала се до 79,9%.

Такође, анализиран је хемијски састав и анти-*Candida* ефекат етарских уља одабраних биљних врста породице Asteraceae (*I. helenium* и *H. italicum*). У овој студији, испитали смо хемијски профил уља *H. italicum*, идентификујући укупно 52 једињења, док је анализа узорка уља *I. helenium* утврдила укупно 25 састојака. Најзаступљенији састојци уља врсте *H. italicum* били су нерил-ацетат, α -пинен, γ -куркумен и β -селинен, док су алантолактон и изоалантолактон идентификовани као главна једињења у узорку уља врсте *I. helenium*. Етарска уља смиља и омана, показала су значајан инхибиторни ефекат на хумане клиничке изолате *Candida* са МИК вредностима од 0,312 до 5 mg/mL и 0,009 до 0,312 mg/mL. Применом етарског уља омана утврђен је фунгицидни ефекат у распону концентрација од 0,156 до 2,5 mg/mL, док етарско уље смиља није показало овај ефекат приликом третмана МИК и ½ МИК дозама. Испитивањем типа интеракције са нистатином на тестиране клиничке сојеве *Candida*, резултати су показали синергистички ефекат у свим испитиваним комбинацијама. Обе тестиране концентрације (МИК и ½ МИК) редуковале су способност формирања биофилма и то до 73,5% у односу на продукцију биофилма контролне групе ћелија. Уље омана, које се показало као најактивније, тестирано је у

наредној фази, при чему је показало значајан ефекат на остале факторе вируленције и то 96,1 до 100% редукције герминационих цеви и потпуну антифосфолипазну активност.

У следећој етапи ове студије, истражили смо ефекат етарских уља одабраних биљних врста породице Rutaceae на хумане вулвовагиналне изолате *Candida*. Идентификовали смо хемијске профиле четири уља (*C. aurantium*, *C. aurantifolia*, *C. limon* и *C. paradisi*) при чему су доминантни састојци били лимонен и лимонен-1,2-диол. Етарска уља цитруса показала су значајан инхибиторни ефекат (0,009-10,0 mg/mL) на планктонске ћелије кандиди при чему су одабрана два уља биљака рода *Citrus* која су даље анализирана. Применом МИК дозе, фунгицидни ефекат је утврђен код 59,1% од укупног броја испитиваних третмана. Синергистичко дејство уља поморанџе и лимете међусобно, као и у комбинацији са нистатином утврђено је код 40,0% свих тестираних комбинација, док су остале интеракције представљале адитивни ефекат. Редукција формирања биофилма након третмана двома концентрацијама уља врсте *C. aurantium* и врсте *C. aurantifolia* кретала се до 50,6%. Након испитивања анти-*Candida* активности, као најактивније издвојило се уље поморанџе чији је утицај (у МИК и ½ МИК дози) тестиран на герминативну способност ћелија кандиди. Примећено је значајно смањење продукције герминационих цеви, при чему је распон вредности редукције износио од 50,0 до 100%. Пошто изолати другог сета нису продуковали фосфолипазу, ова активност није ни тестирана.

Најактивније етарско уље у односу на први сет клиничких изолата кандиди био је узорак уља *I. helenium*, док је други сет вулвовагиналних изолата био најосетљивији на третман етарским уљем *C. aurantium*. Можемо закључити да би ова два природна агенса могла бити подвргнута даљим *in vitro* и *in vivo* тестовима са циљем могуће употребе у терапији кандидоза. Резултати ове докторске дисертације сугеришу да анализирана уља, која ефикасно инхибирају планктонске и биофилм-формирајуће ћелије *Candida*, обећавају као антифунгални агенси у оквиру алтернативних или допунских приступа лечењу инфекција изазваних клиничким сојевима који узрокују кандидозе.

Резултати приказани у овој докторској дисертацији су објављени у једном раду категорије М21а, једном раду категорије М22 и националном часопису категорије М51.

7. SUMMARY

This doctoral dissertation presents a screening of the anti-*Candida* activity of essential oils from selected plant species belonging to the families Lamiaceae, Asteraceae, and Rutaceae.

The study established a significant anti-*Candida* effect of the tested essential oils from selected Lamiaceae species (*S. montana*, *T. vulgaris*, and *O. vulgare*). Chemical composition analysis of the three essential oils identified a total of 118 compounds, with thymol, carvacrol, and *p*-cymene as the major constituents. Using the microdilution method, all three oils demonstrated a notable inhibitory effect on planktonic *Candida* cells, with oregano oil being the most active, showing MIC values ranging from 0.312 to 0.625 mg/mL. At MIC doses, a fungicidal effect was observed in 60.6% of all tested treatments. In addition, the oils were evaluated for potential synergistic interactions, both mutually and in combination with nystatin. Results indicated synergistic effects in 72.2% of the tested combinations, while the remainder exhibited additive effects. The antibiofilm activity of all three oils at MIC and ½ MIC concentrations reached up to 79.9%.

The chemical composition and anti-*Candida* effect of essential oils from selected Asteraceae species (*I. helenium* and *H. italicum*) were also analyzed. In this study, the chemical profile of *H. italicum* oil was examined, identifying a total of 52 compounds, while the analysis of *I. helenium* oil revealed 25 constituents. The most abundant compounds in *H. italicum* oil were neryl acetate, α -pinene, γ -curcumene, and β -selinene, while alantolactone and isoalantolactone were identified as the major constituents of *I. helenium* oil. Both oils demonstrated significant inhibitory effects against human clinical *Candida* isolates, with MIC values ranging from 0.312 to 5 mg/mL for *H. italicum* and 0.009 to 0.312 mg/mL for *I. helenium*. Fungicidal activity of *I. helenium* oil was established within the concentration range of 0.156 to 2.5 mg/mL, whereas *H. italicum* oil did not exhibit fungicidal effects at MIC or ½ MIC doses. When tested in combination with nystatin against clinical *Candida* isolates, synergistic effects were observed in all tested combinations. Both tested concentrations (MIC and ½ MIC) reduced biofilm formation by up to 73.5% compared to the biofilm production of the control group. *I. helenium* oil, being the most active, was further tested and showed a significant effect on additional virulence factors, with 96.1–100% reduction of germ tube formation and complete inhibition of phospholipase activity.

In the next phase of the study, the effects of essential oils from selected Rutaceae species on human vulvovaginal *Candida* isolates were investigated. Chemical profiles of four oils (*C. aurantium*, *C. aurantifolia*, *C. limon*, and *C. paradisi*) were identified, with limonene and limonene-1,2-diol being the dominant constituents. Citrus essential oils exhibited significant inhibitory activity (0.009–10.0 mg/mL) against planktonic *Candida* cells, leading to the selection of two *Citrus* oils for further analyses. At MIC doses, fungicidal activity was observed in 59.1% of all tested treatments. Synergistic effects between orange and lime oils, as well as their combinations with nystatin, were established in 40.0% of all tested combinations, while the remaining interactions exhibited additive effects. Biofilm formation was reduced by up to 50.6% after treatment with two concentrations of *C. aurantium* and *C. aurantifolia* oils. Following the evaluation of anti-*Candida* activity, orange oil was identified as the most active. Its effects (at MIC and ½ MIC doses) on germ tube production in *Candida* cells demonstrated significant inhibition, with reductions ranging from 50.0 to 100%. Since the second set of isolates did not produce phospholipase, this activity was not assessed.

The most active essential oil against the first set of clinical *Candida* isolates was *I. helenium*, while the second set of vulvovaginal isolates showed the highest sensitivity to *C. aurantium* oil. It can be concluded that these two natural agents could be subjected to further *in vitro* and *in vivo* investigations with the aim of potential application in the treatment of candidiasis.

The results of this doctoral dissertation suggest that the analyzed oils, which effectively inhibit planktonic and biofilm-forming *Candida* cells, hold promise as antifungal agents within alternative or complementary approaches to the treatment of infections caused by clinical *Candida* strains.

The findings presented in this dissertation have been published in one paper categorized as M21a, one paper categorized as M22, and in a national journal categorized as M51.

8. ЛИТЕРАТУРА

- Abdulmajeed, S. M. (2015). Detection of oral *Candida* species and investigation from anti-*Candida* activity of *Origanum vulgare* L. essential oil. *Middle East Journal of Scientific Research*, 23(1), 18–25.
- Aćimović, M. (2023). Corsica vs Balkan immortelle essential oil - comparison of chemical profiles. *Alternative Crops and Cultivation Practices*, 5, 1–6.
- Aćimović, M., Ljujić, J., Vulić, J., Zheljazkov, V. D., Pezo, L., Varga, A., & Tumbas Šaponjac, V. (2021). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Essential Oil from Serbia: Chemical Composition, Classification and Biological Activity—May It Be a Suitable New Crop for Serbia? *Agronomy*, 11(7), 1282.
- Aćimović, M., Šovljanski, O., Pezo, L., Travičić, V., Tomić, A., Zheljazkov, V. D., Ćetković, G., Švarc-Gajić, J., Brezo-Borjan, T., & Sofrenić, I. (2022). Variability in Biological Activities of *Satureja montana* Subsp. *montana* and Subsp. *variegata* Based on Different Extraction Methods. *Antibiotics*, 11(9), 1235.
- Aćimović, M., Stanković, J., Cvetković, M., Simin, N., Beara, I., Lesjak, M., & Popović, V. (2020). Chemical composition of *Origanum dictamnus* and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from Greece. *Book of Proceedings - GEA (Geo Eco-Eco Agro) International Conference*, 1, 244–249.
- Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed. In *Allured Publishing, Carol Stream, IL, USA*.
- Ahmad, A., Mbalale, M., Dougrigue, E., Mbaiguinam, M., & Jazet, P. M. (2024). Extraction and determination of antioxidant properties of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) or (Labiataeae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 18(3), 765–778.
- Ahmad, A., Van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2014). Unravelling the Complex Antimicrobial Interactions of Essential Oils — The Case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules*, 19(3), 2896–2910.

- Ahmedi, S., Pant, P., Raj, N., & Manzoor, N. (2022). Limonene inhibits virulence associated traits in *Candida albicans*: In-vitro and in-silico studies. *Phytomedicine Plus*, 2(3), 100285.
- Ailli, A., Handaq, N., Touijer, H., Gourich, A. A., Drioiche, A., Zibouh, K., Eddamsyry, B., El Makhouchi, F., Mouradi, A., Bin Jordan, Y. A., Bourhia, M., Elomri, A., & Zair, T. (2023). Phytochemistry and Biological Activities of Essential Oils from Six Aromatic Medicinal Plants with Cosmetic Properties. *Antibiotics*, 12(4), 721.
- Ainseba, N., Loukili, N., Soulimane, A., Bellifa, S., Dib, M. E. A., & Muselli, A. (2024). Antimicrobial and Antifungal Effects of Essential Oils from *Origanum vulgare*, *Lavandula officinalis*, and *Syzygium aromaticum* on Bacterial Strains through Gaseous Contact. *Anti-Infective Agents*, 22(4), 53–59.
- Akarca, G., & Sevik, R. (2021). Biological Activities of *Citrus limon* L. and *Citrus sinensis* L. Peel Essential Oils. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 24(6), 1415–1427.
- Akermi, S., Smaoui, S., Fourati, M., Elhadef, K., Chaari, M., Chakchouk Mtibaa, A., & Mellouli, L. (2022). In-Depth Study of *Thymus vulgaris* Essential Oil: Towards Understanding the Antibacterial Target Mechanism and Toxicological and Pharmacological Aspects. *BioMed Research International*, 2022(1), 3368883.
- Akkaoui, S., Johansson, A., Yagoubi, M., Haubek, D., El Hamidi, A., Rida, S., Claesson, R., & Ennibi, O. (2020). Chemical Composition, Antimicrobial activity, In Vitro Cytotoxicity and Leukotoxin Neutralization of Essential Oil from *Origanum vulgare* against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens*, 9(3), 192.
- Al-Aamri, M. S., Pharm, B., Al-Abousi, M., Al-Jabri, S. S., Alam, T., & Khan, S. A. (2018). Chemical composition and in-vitro antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus aurantifolia* L. leaves grown in Eastern Oman it useful for food, pharmaceutical, and perfumery industries. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 13(2), 108–112.
- Ali, A. (2021). Chemical Composition, α -Glucosidase Inhibitory and Anticancer Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* Leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 24(4), 695–703.

- Alkan, M. (2020). Chemical composition and insecticidal potential of different *Origanum* spp.(Lamiaceae) essential oils against four stored product pests. *Turkish Journal of Entomology*, 44(2), 149–163.
- Almeida, L. D. F. D. D., Paula, J. F. D., Almeida, R. V. D. D., Williams, D. W., Hebling, J., & Cavalcanti, Y. W. (2016). Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74(5), 393–398.
- Almeida, P. D., Blanco-Pascual, N., Rosolen, D., Cisilotto, J., Creczynski-Pasa, T., & Laurindo, J. (2022). Antioxidant and antifungal properties of essential oils of oregano (*Origanum vulgare*) and mint (*Mentha arvensis*) against *Aspergillus flavus* and *Penicillium commune* for use in food preservation. *Food Science and Technology*, 42, e64921.
- Alshaikh, N. A., & Perveen, K. (2021). Susceptibility of Fluconazole-Resistant *Candida albicans* to Thyme Essential Oil. *Microorganisms*, 9(12), 2454.
- Alviano, W. S., Mendonça-Filho, R. R., Alviano, D. S., Bizzo, H. R., Souto-Padrón, T., Rodrigues, M. L., Bolognese, A. M., Alviano, C. S., & Souza, M. M. G. (2005). Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(2), 101–105.
- Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K. A., & Nikhat, M. (2010). Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine*, 17(12), 921–925.
- Ammar, A. H., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Romdhane, M., & Zagrouba, F. (2012). Chemical Composition and in vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Citrus aurantium* L. Flowers Essential Oil (Neroli Oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(21).
- Arámbula, C. I., Diaz, C. E., & Garcia, M. (2019). Performance, chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* and *Origanum vulgare*. *Journal of Physics: Conference Series*, 1386(1), 12059.
- Asensio, C. M., Grosso, N. R., & Juliani, H. R. (2015). Quality characters, chemical composition

- and biological activities of oregano (*Origanum* spp.) Essential oils from Central and Southern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 63, 203–213.
- Ashmawy, N. S., Nilofar, N., Zengin, G., & Eldahshan, O. A. (2024). Metabolic profiling and enzyme inhibitory activity of the essential oil of *Citrus aurantium* fruit peel. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24(1), 1–8.
- Asker, M., El-Gengaihi, S. E., Hassan, E. M., Mohammed, M. A., & Abdelhamid, S. A. (2020). Phytochemical constituents and antibacterial activity of *Citrus lemon* leaves. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1–7.
- Avola, R., Granata, G., Geraci, C., Napoli, E., Graziano, A. C. E., & Cardile, V. (2020). Oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil provides anti-inflammatory activity and facilitates wound healing in a human keratinocytes cell model. *Food and Chemical Toxicology*, 144, 111586.
- Bacic, A., Prazina, N., Hadzic-Hasanovic, V., Dacic, M., Ajanovic, A., & Mahmutoviic, O. (2021). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don from Bosnia and Herzegovina. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22, 67–73.
- Badalamenti, N., Bruno, M., Schicchi, R., Geraci, A., Leporini, M., Gervasi, L., Tundis, R., & Loizzo, M. R. (2022). Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Essential Oils, and Their Combinations, Obtained from Flavedo By-Product of Seven Cultivars of Sicilian *Citrus aurantium* L. *Molecules*, 27(5), 1580.
- Baj, T., Biernasiuk, A., Wróbel, R., & Malm, A. (2020). Chemical composition and in vitro activity of *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Thymus serpyllum* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils towards oral isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Open Chemistry*, 18(1), 108–118.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Bakó, C., Balázs, V. L., Kerekes, E., Kocsis, B., Nagy, D. U., Szabó, P., Micalizzi, G., Mondello, L., Krisch, J., Pethő, D., & Horváth, G. (2023). Flowering phenophases influence the

- antibacterial and anti-biofilm effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 168.
- Behbahani, M., Ghareh Hassanlou, P., Amini, M. M., Omid, F., Esrafil, A., Farzadkia, M., & Bagheri, A. (2015). Application of solvent-assisted dispersive solid phase extraction as a new, fast, simple and reliable preconcentration and trace detection of lead and cadmium ions in fruit and water samples. *Food Chemistry*, 187, 82–88.
- Benzaid, C., Belmadani, A., Tichati, L., Djeribi, R., & Rouabhia, M. (2021). Effect of *Citrus aurantium* L. Essential Oil on *Streptococcus mutans* Growth, Biofilm Formation and Virulent Genes Expression. *Antibiotics*, 10(1), 54.
- Blanc, A. R., Sortino, M. A., Butassi, E., & Svetaz, L. A. (2023). Synergistic effects of *Thymus vulgaris* essential oil in combination with antifungal agents and inhibition of virulence factors of *Candida albicans*. *Phytomedicine Plus*, 3(4), 100481.
- Bora, L., Burkard, T., Juan, M. H. S., Radeke, H. H., Muş, A. M., Vlaia, L. L., Magyari-Pavel, I. Z., Diaconeasa, Z., Socaci, S., Borcan, F., Kis, B., Muntean, D., Dehelean, C. A., & Danciu, C. (2022). Phytochemical Characterization and Biological Evaluation of *Origanum vulgare* L. Essential Oil Formulated as Polymeric Micelles Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 14(11), 2413.
- Borugă, O., Jianu, C., Mişcă, C., Goleţ, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, 7(Spec Iss 3), 56–60.
- Boukhatem, M. N., Darwish, N. H. E., Sudha, T., Bahlouli, S., Kellou, D., Benelmouffok, A. B., Chader, H., Rajabi, M., Benali, Y., & Mousa, S. A. (2020). In Vitro Antifungal and Topical Anti-Inflammatory Properties of Essential Oil from Wild-Growing *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) Used for Medicinal Purposes in Algeria: A New Source of Carvacrol. *Scientia Pharmaceutica*, 88(3), 33.
- Bourrel, C., Vilarem, G., & Perineau, F. (1993). Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of elecampane (*Inula helenium* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 5(4), 411–417.

- Boussaada, O., & Chemli, R. (2006). Chemical Composition of Essential Oils from Flowers, Leaves and Peel of *Citrus aurantium* L. var. *amara* from Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 9(2), 133–139.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019). Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(5), 301–311.
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1–2), 1–17.
- Budán, F., Nan, M., Kocsis, B., & Laczkó-Zöld, E. (2021). Antimicrobial activity and potential secondary signal transduction mechanisms of elecampane (*Inula helenium* L.) root extract. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22(7&8), 86–92.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Busatta, C., Barbosa, J., Cardoso, R. I., Paroul, N., Rodrigues, M., Oliveira, D. de, Oliveira, J. V. de, & Cansian, R. L. (2017). Chemical profiles of essential oils of marjoram (*Origanum majorana*) and oregano (*Origanum vulgare*) obtained by hydrodistillation and supercritical CO₂. *Journal of Essential Oil Research*, 29(5), 367–374.
- Butassi, E., Svetaz, L., Carpinella, M. C., Efferth, T., & Zacchino, S. (2021). Fungal Biofilms as a Valuable Target for the Discovery of Natural Products That Cope with the Resistance of Medically Important Fungi—Latest Findings. *Antibiotics*, 10(9), 1053.
- Calamari, S. E., Bojanich, M. A., Barembaum, S. R., Berdicevski, N., & Azcurra, A.-I. (2011). Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. *Journal Section: Oral Medicine and Pathology*, 16(1), e23-28.
- Cantrell, C. L., Abate, L., Fronczek, F. R., Franzblau, S. G., Quijano, L., & Fischer, N. H. (1999). Antimycobacterial eudesmanolides from *Inula helenium* and *Rudbeckia subtomentosa*. *Planta Medica*, 65(4), 351–355.

- Capdevila, S., Grau, D., Cristóbal, R., Moré, E., & De las Heras, X. (2025). Chemical composition of wild populations of *Thymus vulgaris* and *Satureja montana* in central Catalonia, Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture Reports*, 5(6), 234–246.
- Caprioli, G., Lupidi, G., & Maggi, F. (2019). Comparison of chemical composition and antioxidant activities of two Winter savory subspecies (*Satureja montana* subsp. *variegata* and *Satureja montana* subsp. *montana*) cultivated in Northern Italy. *Natural Product Research*, 33(21), 3143–3147.
- Caputo, L., Amato, G., de Bartolomeis, P., De Martino, L., Manna, F., Nazzaro, F., De Feo, V., & Barba, A. A. (2022). Impact of drying methods on the yield and chemistry of *Origanum vulgare* L. essential oil. *Scientific Reports*, 12(1), 1–11.
- Ćavar Zeljković, S., Šolić, M. E., & Maksimović, M. (2015). Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. *Natural Product Research*, 29(19), 1874–1877.
- Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., & Martínez, J. P. (1998). Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 130–180.
- Chahboun, N., Barrahi, A., Koursaoui, L., Mortada, S., Fahsi, K., Flouchi, R., Karrouchi, K., Faouzi, M. E. A., Faydy, M. El, Abuelizz, H. A., Thakur, A., Fikri-Benbrahim, K., & Zarrouk, A. (2024). Chemical composition, biological activities, and anti-corrosion performance of Moroccan essential oil *Thymus vulgaris* from the Oued Amlil region, Taza. *International Journal of Electrochemical Science*, 19(12), 100859.
- Chbel, A., Elmakssoudi, A., Rey-Méndez, M., Barja, J. L., Filali, O. A., Soukri, A., & Khalfi, B. El. (2022). Comparative Study of Essential Oil Composition, Anti-bacterial And Antioxidant Activities of the Aerial Parts of *Thymus vulgaris* Grown in Morocco and France. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(2), 380–392.
- Chinou, I. B., Roussis, V., Perdetzoglou, D., & Loukis, A. (1996). Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. *Planta Medica*, 62(4), 377–379.
- Chintaluri, A. K., Komarraju, A. L., Chintaluri, V. K., & Vemulapalli, B. (2015). Comparative

- study of antimicrobial activity of essential oils of selected plants of Rutaceae and TLC bioautographic studies for detection of bioactive compounds. *Journal of Essential Oil Research*, 27(1), 9–16.
- Cid-Chevecich, C., Müller-Sepúlveda, A., Jara, J. A., López-Muñoz, R., Santander, R., Budini, M., Escobar, A., Quijada, R., Criollo, A., Díaz-Dosque, M., & Molina-Berrios, A. (2022). *Origanum vulgare* L. essential oil inhibits virulence patterns of *Candida* spp. and potentiates the effects of fluconazole and nystatin in vitro. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 1–13.
- Cleff, M. B., Meinerz, A. R., Xavier, M., Schuch, L. F., Meireles, M. C. A., Rodrigues, M. R. A., & Mello, J. R. B. D. (2010). In Vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil of against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 116–123.
- Clevenger, J. F. (1928). Apparatus for the Determination of Volatile Oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association* (1912), 17(4), 345–349.
- Čopra-Janićijević, A., Vidic, D., & Maksimović, M. (2020). Chemical composition of the essential oil and headspace of *Satureja montana* L. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 7(2), 22–34.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 130–135.
- Costa, R., Bisignano, C., Filocamo, A., Grasso, E., Occhiuto, F., & Spadaro, F. (2014). Antimicrobial activity and chemical composition of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops. *Journal of Essential Oil Research*, 26(6), 400–408.
- Couto, C. S. F., Raposo, N. R. B., Rozental, S., Borba-Santos, L. P., Bezerra, L. M. L., de Almeida, P. A., & Brandão, M. A. F. (2015). Chemical Composition and Antifungal Properties of Essential Oil of *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(7), 1207–1212.
- Cruz-Valenzuela, M. R., Tapia-Rodríguez, M. R., Vazquez-Armenta, F. J., Silva-Espinoza, B. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). Lime (*Citrus aurantifolia*) Oils. *Essential Oils in Food*

Preservation, Flavor and Safety, 531–537.

- Chandra, J., Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Faddoul, F. F., Hoyer, L. L., Douglas, L. J., & Ghannoum, M. A. (2001). Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *Journal of Dental Research*, 80(3), 903-908.
- D'Amato, S., Rossi, C., Maggio, F., Valbonetti, L., Savini, V., Paparella, A., & Serio, A. (2024). Antilisterial Effectiveness of *Origanum vulgare* var. *hirtum* and *Coridothymus capitatus* Essential Oils and Hydrolates Alone and in Combination. *Foods*, 13(6), 860.
- D'Auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L., & Mazzanti, G. (2005). Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology*, 43(5), 391–396.
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128–138.
- Dao, T. P., Tran, N. Q., Tran, T. T., & Lam, V. T. (2022). Assessing the kinetic model on extraction of essential oil and chemical composition from lemon peels (*Citrus aurantifolia*) by hydro-distillation process. *Materials Today: Proceedings*, 51, 172–177.
- Dash, K. T., Jena, S., Ray, A., Sahoo, A., Kar, S. K., Sahoo, R. K., Subudhi, E., Panda, P. C., & Nayak, S. (2021). Chemical Composition of Carvacrol Rich Leaf Essential Oil of *Thymus vulgaris* from India: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Potential. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 24(5), 1134–1145.
- de Andrade, T. D., Luiz, S. A., de Castro Dutra, J., da Cruz, M. M., & dos Santos, H. C. A. S. (2023). Evaluation of the inhibition of strains of *Candida albicans* by the essential oil of *Origanum vulgare*. *Brazilian Journal of Development*, 9(3), 8951–8961.
- de Castro, R. D., de Souza, T. M. P. A., Bezerra, L. M. D., Ferreira, G. L. S., de Brito Costa, E. M. M., & Cavalcanti, A. L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: An in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1).

- Değirmenci, H., & Erkurt, H. (2020). Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium* L. flowers. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1), 58–67.
- Deleanu, M., Popa, E., Chim, M. (2018). Chemical composition and active properties evaluation of wild oregano (*Origanum Vulgare*) and ginger (*Zingiber Officinale-Roscoe*) essential oils. *Revista de Chimie*, 69, 1927–1933.
- Delgado, A. J. M., Velázquez, U. C., González, J. G. B., Montes, A. C., Villarreal, S. M. L., García, L. E. V., Casas, R. M. S., & Luis, O. E. R. (2020). Evaluation of the Essential Oil of *Citrus paradisi* as an Alternative Treatment against *Candida albicans*. *Open Journal of Stomatology*, 10(09), 258–270.
- Deng, M., Dong, L., Jia, X., Huang, F., Chi, J., Muhammad, Z., Ma, Q., Zhao, D., Zhang, M., & Zhang, R. (2022). The flavonoid profiles in the pulp of different pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) and grapefruit (*Citrus paradisi* Mcfad) cultivars and their in vitro bioactivity. *Food Chemistry: X*, 15, 100368.
- Deorukhkar, S. C., Saini, S., & Mathew, S. (2014). Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *International Journal of Microbiology*, 2014, 1–6.
- Deriu, A., Zanetti, S., Marongiu, B., Piras, A., & Porcedda, S. (2008). Antimicrobial activity of *Inula helenium* L. essential oil against gram positive, gram negative bacteria and *Candida* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 588–590.
- Dhanavade, M. J., Jalkute, C. B., Sonawane, K., Ghosh, J. S., Jalkute Shri Shivaji Mahavidyalaya, C. B., Author, C., & Sonawane, K. D. (2011). Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.) Peel Extract. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2(3), 119–122.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4863–4870.
- Di Vito, M., Cacaci, M., Barbanti, L., Martini, C., Sanguinetti, M., Benvenuti, S., Tosi, G.,

- Fiorentini, L., Scozzoli, M., Bugli, F., & Mattarelli, P. (2020). *Origanum vulgare* Essential Oil vs. a Commercial Mixture of Essential Oils: In Vitro Effectiveness on *Salmonella* spp. from Poultry and Swine Intensive Livestock. *Antibiotics*, 9(11), 763.
- Diab, D. O., Fathy, M. S., Elsaid, N., Elhady, S. A., & Ahmed, Y. M. (2024). Evaluation of antifungal activity of *Origanum vulgare* essential oil and detection of its influence on CDR1 gene expression among *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *Microbes and Infectious Diseases*, 5(4), 1654–1666.
- Djihane, B., Wafa, N., Elkhamssa, S., Pedro, D. H. J., Maria, A. E., & Mohamed Mihoub, Z. (2017). Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(5), 780–787.
- Dobreva, K., Dimov, M., Valev, T., Iliev, I., Damyanova, S., Oprea, O. B., & Stoyanova, A. (2024). Chemical Composition and Antioxidant Activities of Three Bulgarian Garden Thyme Essential Oils. *Applied Sciences (Switzerland)*, 14(22), 10261.
- Dodoš, T., Janković, S., Marin, P. D., & Rajčević, N. (2021). Essential Oil Composition and Micromorphological Traits of *Satureja montana* L., *S. subspicata* Bartel ex Vis., and *S. kitaibelii* Wierzb. Ex Heuff. Plant Organs. *Plants*, 10(3), 511.
- Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. (2018). Biological Activities and Safety of *Citrus* spp. Essential Oils. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 1966, 19(7), 1966.
- Dríoiche, A., Zahra Radi, F., Ailli, A., Bouzoubaa, A., Boutakiout, A., Mekdad, S., AL Kamaly, O., Saleh, A., Maouloua, M., Boust, D., Sahpaz, S., EL Makhoukhi, F., & Zair, T. (2022). Correlation between the chemical composition and the antimicrobial properties of seven samples of essential oils of endemic *Thymus* in Morocco against multi-resistant bacteria and pathogenic fungi. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 30(8), 1200–1214.
- Dutra, T. V., Castro, J. C., Menezes, J. L., Ramos, T. R., do Prado, I. N., Machinski, M., Mikcha, J. M. G., & Filho, B. A. de A. (2019). Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. *Industrial Crops and Products*, 129, 345–349.

- Dzamic, A. M., Mileski, K. S., Ciric, A. D., Ristic, M. S., Sokovic, M. D., & Marin, P. D. (2019). Essential Oil Composition, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Essential Oil and Deodorized Extracts of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(2), 493–503.
- Ed-Dra, A., Nalbone, L., Filali, F. R., Trabelsi, N., El Majdoub, Y. O., Bouchrif, B., Giarratana, F., & Giuffrida, A. (2021). Comprehensive Evaluation on the Use of *Thymus vulgaris* Essential Oil as Natural Additive against Different Serotypes of *Salmonella enterica*. *Sustainability*, 13(8), 4594.
- El-Sayed, S. M., & El-Sayed, H. S. (2021). Antimicrobial nanoemulsion formulation based on thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil for UF labneh preservation. *Journal of Materials Research and Technology*, 10, 1029–1041.
- El Aboubi, M., Hdech, B. D., Bikri, S., Benayad, A., El Magri, A., Aboussaleh, Y., & Aouane, E. M. (2023). Chemical composition of essential oils of *Citrus limon* peel from three Moroccan regions and their antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic and. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 12(1), 118–127.
- Elgat, W. A. A., Kordy, A. M., Böhm, M., Černý, R., Abdel-Megeed, A., & Salem, M. Z. (2020). *Eucalyptus camaldulensis*, *Citrus aurantium*, and *Citrus sinensis* Essential Oils as Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, and *Fusarium culmorum*. *Processes*, 8(8), 1003.
- Elhawary, E. A., Nilofar, N., Zengin, G., & Eldahshan, O. A. (2024). Variation of the essential oil components of *Citrus aurantium* leaves upon using different distillation techniques and evaluation of their antioxidant, antidiabetic, and neuroprotective effect against Alzheimer's disease. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24(1), 1–10.
- Ergashboevna, D. D., Failyevna, M. R., Anormatovich, S. S., Dzhamilievich, S. I., Bakirugli, E. F., Sadykovna, A. S., & Dzhalilovich, A. N. (2024). Volatile components of *Inula helenium* and *I. grandis*, growing in Uzbekistan. *Химия Растительного Сырья*, 3(3), 144–149.
- Ermenlieva, N., Georgieva, E., Mihaylova, S., Stamova, S., Laleva, K., Tsankova, G., & Tsvetkova, A. (2022). Synergistic interaction between Lamiaceae essential oils and

- antifungal drugs against *Candida albicans* ATCC 10231. *FARMACIA*, 70, 4.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22(6), 896–902.
- Falagas, M. E., Roussos, N., & Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), e954–e966.
- Ferraz, C. A., Sousa, A. C. A., Caramelo, D., Delgado, F., de Oliveira, A. P., & Pastorinho, M. R. (2022). Chemical profile and eco-safety evaluation of essential oils and hydrolates from *Cistus ladanifer*, *Helichrysum italicum*, *Ocimum basilicum* and *Thymbra capitata*. *Industrial Crops and Products*, 175, 114232.
- Ferrer, V., Costantino, G., Paoli, M., Paymal, N., Quinton, C., Ollitrault, P., Tomi, F., & Luro, F. (2021). Intercultivar diversity of sour orange (*Citrus aurantium* L.) based on genetic markers, phenotypic characteristics, aromatic compounds and sensorial analysis. *Agronomy*, 11(6), 1084.
- Fikry, S., Khalil, N., & Salama, O. (2019). Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, 9(1), 1–10.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 156–164.
- Fouad, R., Bousta, D., Abdelhakim, E. O. L., Chahdi, F. O., Amri, I., Jamoussi, B., & Greche, H. (2015). Chemical Composition and Herbicidal Effects of Essential Oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Eucalyptus cladocalyx*, *Origanum vulgare* L. and *Artemisia absinthium* L. cultivated in Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(1), 112–123.
- Fraternale, D., Flamini, G., & Ascrizzi, R. (2019). In Vitro Anticollagenase and Antielastase Activities of Essential Oil of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don. *Journal of*

- Medicinal Food*, 22(10), 1041–1046.
- Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N. L., Vukic, M., Štefániková, J., Duranova, H., Kowalczewski, P. Ł., Čmíkova, N., & Kačániová, M. (2021). *Thymus vulgaris* essential oil and its biological activity. *Plants*, 10(9), 1959.
- Galovičová, L., Borotová, P., Vukovic, N. L., Vukic, M., Kunová, S., Hanus, P., Kowalczewski, P. Ł., Bakay, L., & Kačániová, M. (2022). The Potential Use of *Citrus aurantifolia* L. Essential Oils for Decay Control, Quality Preservation of Agricultural Products, and Anti-Insect Activity. *Agronomy*, 12(3), 735.
- Gauch, L. M. R., Silveira-Gomes, F., Esteves, R. A., Pedrosa, S. S., Gurgel, E. S. C., Arruda, A. C., & Marques-da-Silva, S. H. (2014). Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(3), 389–391.
- Genčić, M. S., Aksić, J. M., Živković Stošić, M. Z., Randjelović, P. J., Stojanović, N. M., Stojanović-Radić, Z. Z., & Radulović, N. S. (2021). Linking the antimicrobial and anti-inflammatory effects of immortelle essential oil with its chemical composition – The interplay between the major and minor constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 158, 112666.
- Ghannoum, M. A. (2000). Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 122–143.
- Giovanelli, S., Ciccarelli, D., Giusti, G., Mancianti, F., Nardoni, S., & Pistelli, L. (2020). Comparative assessment of volatiles in juices and essential oils from minor *Citrus* fruits (Rutaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 35(6), 639–652.
- Gismondi, A., Di Marco, G., & Canini, A. (2020). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil: Composition and potential antineoplastic effect. *South African Journal of Botany*, 133, 222–226.
- Glumac, M., Jažo, Z., Paštar, V., Golemac, A., Čikeš Čulić, V., Bektić, S., Radan, M., & Carev, I. (2023). Chemical Profiling and Bioactivity Assessment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Essential Oil: Exploring Pure Compounds and Synergistic Combinations. *Molecules*,

28(14), 5299.

- Gniewosz, M., Kraśniewska, K., Kosakowska, O., Pobiega, K., & Wolska, I. (2017). Chemical compounds and antimicrobial activity of petitgrain (*Citrus aurantium* L. var. *amara*) essential oil. *Herba Polonica*, 63(4), 18–25.
- Gonceariuc, M., Balmush, Z., Benea, A., Barsan, V., & Sandu, T. (2015). Biochemical diversity of the *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (link) ietswaart genotypes from Moldova. *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele Vieţii*, 326(2), 92–100.
- Gruľová, D., Caputo, L., Elshafie, H. S., Baranová, B., de Martino, L., Sedlák, V., Gogaľová, Z., Poráčová, J., Camele, I., & de Feo, V. (2020). Thymol Chemotype *Origanum vulgare* L. Essential Oil as a Potential Selective Bio-Based Herbicide on Monocot Plant Species. *Molecules*, 25(3), 595.
- Gucwa, K., Milewski, S., Dymerski, T., & Szweda, P. (2018). Investigation of the Antifungal Activity and Mode of Action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* Essential Oils. *Molecules*, 23(5), 1116.
- Güleç, M., Yazıcı-Tütüniş, S., İşcan, G., Demirci, B., Tan, E., Miski, M., & Tan, N. (2024). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils Obtained from *Inula germanica* L. *Records of Natural Products*, 18(6), 618–628.
- Hacıoglu, M., Oyardi, O., & Kirinti, A. (2021). Oregano essential oil inhibits *Candida* spp. biofilms. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 76(11), 443–450.
- Hadžibeti, Đ., Vojinović, T., Nikolić, M., Božić, D. D., & Stanković, J. A. (2024). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* from Mediterranean Coast. *FARMACIA*, 72, 1098.
- Hajlaoui, H., Arraouadi, S., Mighri, H., Aouadi, K., Snoussi, M., Noumi, E., & Kadri, A. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus vulgaris* L. essential oil growing wild in

- Tunisia. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(60B), 1560–1571.
- Hamdi, A., Horchani, M., Jannet, H. Ben, Snoussi, M., Noumi, E., Bouali, N., Kadri, A., Polito, F., De Feo, V., & Edziri, H. (2023). In Vitro Screening of Antimicrobial and Anti-Coagulant Activities, ADME Profiling, and Molecular Docking Study of *Citrus limon* L. and *Citrus paradisi* L. Cold-Pressed Volatile Oils. *Pharmaceuticals*, 16(12), 1669.
- Hammer, A., Carson, F., Dunstan, A., Hale, J., Lehmann, H., Robinson, J., Prescott, L., & Riley, V. (2008). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of five *Taxandria fragrans* oils in vitro. *Microbiology and Immunology*, 52(11), 522–530.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2000). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 38(5), 354–362.
- Han, F., Ma, G. qiang, Yang, M., Yan, L., Xiong, W., Shu, J. cheng, Zhao, Z. dong, & Xu, H. lin. (2017). Chemical composition and antioxidant activities of essential oils from different parts of the oregano. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 18(1), 79.
- Hani, U., Shivakumar, H. G., Vaghela, R., Ali Osmani, R. M., & Shrivastava, A. (2015). Candidiasis: A Fungal Infection- Current Challenges and Progress in Prevention and Treatment. *Infectious Disorders – Drug Targets*, 15(1), 42–52.
- Hao, Y., Li, J., & Shi, L. (2021). A Carvacrol-Rich Essential Oil Extracted From Oregano (*Origanum vulgare* “Hot & Spicy”) Exerts Potent Antibacterial Effects Against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 741861.
- Hendry, E. R., Worthington, T., Conway, B. R., & Lambert, P. A. (2009). Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), 1219–1225.
- Heni, S., Boughendjioua, H., Bennadja, S., & Djahoudi, A. (2021). Essential oil composition of *Origanum vulgare* and its application in substitution of synthetic chemical additives. *Journal of Phytology*, 13, 95–100.
- Henriques, M., Martins, M., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2007). Effect of farnesol on *Candida*

- dublinskiensis* morphogenesis. *Letters in Applied Microbiology*, 44(2), 199–205.
- Hernandez-Ochoa, L., Vilarem, G., Mouloungui, Z., & Medina-Gonzalez, Y. (2012). Comparing the effect of utilization of ethyl heptanoate as co-solvent during extraction of essential oil of *Inula helenium* in a hydrodistillation process. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(6), 995–997.
- Höfs, S., Mogavero, S., & Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, 54(3), 149–169.
- Hojjati, M., Prof, A., & Azhdarzadeh, F. (2016). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Leaf, Ripe and Unripe Peel of Bitter Orange (*Citrus aurantium*) Essential Oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1), 43–50.
- Hou, G. W., & Huang, T. (2024). Essential oils as promising treatments for treating *Candida albicans* infections: research progress, mechanisms, and clinical applications. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1400105.
- Hudz, N., Makowicz, E., Shanaida, M., Białon, M., Jasicka-Misiak, I., Yezerska, O., Svydenko, L., & Wieczorek, P. P. (2020). Phytochemical Evaluation of Tinctures and Essential Oil Obtained from *Satureja montana* Herb. *Molecules*, 25(20), 4763.
- Huo, Y., Shi, H. M., Wang, M. Y., Li, X. B., & Bo Li, X. (2008). Chemical constituents and pharmacological properties of Radix Inulae. *Pharmazie*, 63, 699–703.
- Ilić, Z., Stanojević, L., Milenković, L., Šunić, L., Milenković, A., Stanojević, J., & Cvetković, D. (2022). The Yield, Chemical Composition, and Antioxidant Activities of Essential Oils from Different Plant Parts of the Wild and Cultivated Oregano (*Origanum vulgare* L.). *Horticulturae*, 8(11), 1042.
- Imran, K., Saeed, M., Atif Randhawa, M., & Rizwan Sharif, H. (2013). Extraction and Applications of Grapefruit (*Citrus paradisi*) Peel Oil Against *E. coli*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12(6), 534–537.
- Jaber, H., Oubihi, A., Ouryemchi, I., Boulamtat, R., Oubayoucef, A., Bourkhiss, B., & Ouhssine,

- M. (2021). Chemical Composition and Antibacterial Activities of Eight Plant Essential Oils from Morocco against *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Turkey Organs. *Biochemistry Research International*, 2021(1), 6685800.
- Jacobsen, I. D., & Hube, B. (2017). *Candida albicans* morphology: still in focus. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 15(4), 327–330.
- Jannati, N., Gharachorloo, M., & Honarvar, M. (2021). Extraction of thymol compound from *Thymus vulgaris* L. oil. *Journal of Medicinal Plants and By-Products*, 1, 81–84.
- Jarić, S., Popović, Z., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., Mitrović, M., & Pavlović, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 160–175.
- Jeddi, M., Fikri-Benbrahim, K., Hachlafi, N. El, Benkhaira, N., Aboussemdei, A., & Ouaritini, Z. B. (2023). Chemical Composition of *Thymus vulgaris*, *Origanum compactum* and *Vetiveria zizanioides* Essential oils and their Antibacterial and Antioxidant Activities. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 7(1), 2244.
- Jianu, C., Lukinich-Gruia, A. T., Rădulescu, M., Mioc, M., Mioc, A., Constantin, A. T., David, I., Bujancă, G., & Radu, R. G. (2023). Essential Oil of *Origanum vulgare* var. *aureum* L. from Western Romania: Chemical Analysis, In Vitro and In Silico Screening of Its Antioxidant Activity. *Applied Sciences*, 13, 5076.
- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., Guan, Y., Sumner, L. W., & Zhou, Z. (2014). Antifungal activity of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3011–3033.
- Jnaid, Y., Yacoub, R., & Al-Biski, F. (2016). Antioxidant and antimicrobial activities of *Origanum vulgare* essential oil. *International Food Research Journal*, 23(4).
- Kačániová, M., Čmíková, N., Vukovic, N. L., Verešová, A., Bianchi, A., Garzoli, S., Ben Saad, R., Ben Hsouna, A., Ban, Z., & Vukic, M. D. (2024). *Citrus limon* Essential Oil: Chemical Composition and Selected Biological Properties Focusing on the Antimicrobial (In Vitro, In

- Situ), Antibiofilm, Insecticidal Activity and Preservative Effect against *Salmonella enterica* Inoculated in Carrot. *Plants*, 13(4), 524.
- Kantarcioğlu, A. S., & Yücel, A. (2002). The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immuno-compromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19(1), 44–48.
- Kaouthar, A., El Houda, N., Ali, B., Ahmed, A., Salah, O., & Yazid, F. C. (2020). Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of *Citrus paradisi* peel essential oil from Algeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(6), 1093–1098.
- Karaman, M., Bogavac, M., Radovanović, B., Sudji, J., Tešanović, K., & Janjušević, L. (2017). *Origanum vulgare* essential oil affects pathogens causing vaginal infections. *Journal of Applied Microbiology*, 122(5), 1177–1185.
- Karpiński, T. M. (2020). Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals. *Biomolecules*, 10(1), 103.
- Karpiński, T. M., Ożarowski, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., & Wolski, H. (2023). Anti-*Candida* and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 28(2), 28.
- Karpiński, T. M., Ożarowski, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., Wolski, H., & Adamczak, A. (2021). Plant Preparations and Compounds with Activities against Biofilms Formed by *Candida* spp. *Journal of Fungi*, 7(5), 360.
- Karthikeyan, V., & Karthikeyan, J. (2014). *Citrus aurantium* (Bitter Orange): A Review of its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *International Journal of Drug Discovery and Herbal Research*, 4(4), 766–772.
- Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2012). Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2), 416–423.
- Khosravi, A. R., Sharifzadeh, A., Nikaein, D., Almaie, Z., & Gandomi Nasrabadi, H. (2018).

- Chemical composition, antioxidant activity and antifungal effects of five Iranian essential oils against *Candida* strains isolated from urine samples. *Journal de Mycologie Medicale*, 28(2), 355–360.
- Kim, J. R., Lim, H. A., Jang, C. H., Kim, J. H., Kim, Y. K., Konishi, T., Han, J., Park, Y., & Kim, J.-S. (2007). Induction of Detoxifying Enzyme by Sesquiterpenes Present in *Inula helenium*. *Journal of Medicinal Food*, 10(3), 503–510.
- Kladar, N. V., Anačkov, G. T., Rat, M. M., Srđenović, B. U., Grujić, N. N., Šefer, E. I., & Božin, B. N. (2015). Biochemical characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: Phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant properties. *Chemistry and Biodiversity*, 12(3), 419–431.
- Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). *Citrus limon* (Lemon) Phenomenon—A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. *Plants*, 9(1), 119.
- Kolypetri, S., Kostoglou, D., Nikolaou, A., Kourkoutas, Y., & Giaouris, E. (2023). Chemical Composition, Antibacterial and Antibiofilm Actions of Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) Essential Oil against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Foods*, 12(15), 2893.
- Konishi, T., Shimada, Y., Nagao, T., Okabe, H., & Konoshima, T. (2002). Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(10), 1370–1372.
- Kosakowska, O., Węglarz, Z., Styczyńska, S., Synowiec, A., Gniewosz, M., & Bączek, K. (2024). Activity of Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Greek Oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), and Common Oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*) Essential Oils against Selected Phytopathogens. *Molecules*, 29(19), 4617.
- Kovačević, Z., Kladar, N., Čabarkapa, I., Radinović, M., Maletić, M., Erdeljan, M., & Božin, B. (2021). New Perspective of *Origanum vulgare* L. and *Satureja montana* L. Essential Oils as Bovine Mastitis Treatment Alternatives. *Antibiotics*, 10(12), 1460.

- Kremer, D., Jože Košir, I., Zovko Končić, M., Čerenak, A., Potočnik, T., Srečec, S., Randić, M., & Kosalec, I. (2015). Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis. (Lamiaceae). *Current Drug Targets*, 16(14), 1623–1633.
- Kryvtsova, M. (2020). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil from *Origanum vulgare* L. in different habitats. *Biotechnologia Acta*, 13(3), 64–72.
- Kundaković, T., Stanojković, T., Kolundžija, B., Marković, S., Šukilović, B., Milenković, M., & Lakušić, B. (2014). Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Satureja montana* subsp. *pisidica* (Lamiaceae). *Natural Product Communications*, 9(4), 569–572.
- Labiad, M. H., Belmaghraoui, W., Ghanimi, A., El-Guezane, C., Chahboun, N., Harhar, H., Egea-Gilabert, C., Zarrouk, A., & Tabyaoui, M. (2022). Biological properties and chemical profiling of essential oils of *Thymus* (*vulgaris*, *algeriensis* and *broussonettii*) grown in Morocco. *Chemical Data Collections*, 37, 100797.
- Lagunes, L., & Rello, J. (2016). Invasive candidiasis: from mycobiome to infection, therapy, and prevention. *European Journal of Clinical Microbiology*, 35(8), 1221–1226.
- Laothaweerungsawat, N., Sirithunyalug, J., & Chaiyana, W. (2020). Chemical Compositions and Anti-Skin-Ageing Activities of *Origanum vulgare* L. Essential Oil from Tropical and Mediterranean Region. *Molecules*, 25(5), 1101.
- Larkin, E., Hager, C., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Retuerto, M., Salem, I., Long, L., Isham, N., Kovanda, L., Borroto-Esoda, K., Wring, S., Angulo, D., & Ghannoum, M. (2017). The emerging pathogen *Candida auris*: Growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(5), 10-1128.
- Lawrence, N., McGown, A., & Nduka, J. A. H. G. P. (2001). Cytotoxic michael-type amine adducts of α -methylene lactones alantolactone and isoalantolactone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(3), 429–431.
- Leite-Andrade, M. C., de Araújo Neto, L. N., Buonafina-Paz, M. D. S., de Assis Graciano dos

- Santos, F., da Silva Alves, A. I., de Castro, M. C. A. B., Mori, E., de Lacerda, B. C. G. V., Araújo, I. M., Coutinho, H. D. M., Kowalska, G., Kowalski, R., Baj, T., & Neves, R. P. (2022). Antifungal Effect and Inhibition of the Virulence Mechanism of D-Limonene against *Candida parapsilosis*. *Molecules*, 27(24), 8884.
- Lemaire, G., Olivero, M., Rouquet, V., Moga, A., Pagnon, A., Cenizo, V., & Portes, P. (2023). Neryl acetate, the major component of Corsican *Helichrysum italicum* essential oil, mediates its biological activities on skin barrier. *Plos One*, 18(3), e0268384.
- Li, Y., Liu, S., Zhao, C., Zhang, Z., Nie, D., Tang, W., & Li, Y. (2022). The Chemical Composition and Antibacterial and Antioxidant Activities of Five Citrus Essential Oils. *Molecules*, 27(20), 7044.
- Lin, H., Li, Z., Sun, Y., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, Q., Cai, T., Xiang, W., Zeng, C., & Tang, J. (2024). D-Limonene: Promising and Sustainable Natural Bioactive Compound. *Applied Sciences*, 14(11), 4605.
- Lin, L. Y., Chuang, C. H., Chen, H. C., & Yang, K. M. (2019). Lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) Essential Oils: Volatile Compounds, Antioxidant Capacity, and Hypolipidemic Effect. *Foods*, 8(9), 398.
- Liu, C., Mishra, A. K., He, B., & Tan, R. (2001). Antimicrobial activities of isoalantolactone, a major sesquiterpene lactone of *Inula racemosa*. *Chinese Science Bulletin*, 46(6), 498–501.
- Lokhande, P. D., Gawai, K. R., Kodam, K. M., Kuchekar, B. S., Chabukswar, A. R., & Jagdale, S. C. (2007). Antibacterial activity of isolated constituents and extract of roots of *Inula racemosa*. *Research Journal of Medicinal Plant*, 1(1), 7–12.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44(9), 3057–3064.
- Maccelli, A., Vitanza, L., Imbriano, A., Frascchetti, C., Filippi, A., Goldoni, P., Maurizi, L., Ammendolia, M. G., Crestoni, M. E., Fornarini, S., Menghini, L., Carafa, M., Marianecchi, C., Longhi, C., & Rinaldi, F. (2019). *Satureja montana* L. Essential Oils: Chemical

- Profiles/Phytochemical Screening, Antimicrobial Activity and O/W NanoEmulsion Formulations. *Pharmaceutics*, 12(1), 7.
- Mancuso, M., Catalfamo, M., Laganà, P., Rappazzo, A. C., Raymo, V., Zampino, D., & Zaccone, R. (2019). Screening of antimicrobial activity of citrus essential oils against pathogenic bacteria and *Candida* strains. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(3), 187–200.
- Mandras, N., Roana, J., Scalas, D., Del Re, S., Cavallo, L., Ghisetti, V., & Tullio, V. (2021). The Inhibition of Non-albicans *Candida* Species and Uncommon Yeast Pathogens by Selected Essential Oils and Their Major Compounds. *Molecules*, 26(16), 4937.
- Manoharan, R. K., Lee, J. H., Kim, Y. G., Kim, S. Il, & Lee, J. (2017). Inhibitory effects of the essential oils α -longipinene and linalool on biofilm formation and hyphal growth of *Candida albicans*. *Biofouling*, 33(2), 143–155.
- Marchaim, D., Lemanek, L., Bheemreddy, S., Kaye, K. S., & Sobel, J. D. (2012). Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstetrics and Gynecology*, 120(6), 1407–1414.
- Martins, N., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Silva, S., & Henriques, M. (2014). Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia*, 177(5–6), 223–240.
- Mastelic, J., Politeo, O., Jerkovic, I., & Radošević, N. (2005). Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(1), 35–40.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128.
- Mechergui, K., Jaouadi, W., Coelho, J. P., & Khouja, M. L. (2016). Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. *Industrial Crops and Products*, 90, 32–37.
- Mehdizadeh, L., Najafgholi, H. M., Biouki, R. Y., & Moghaddam, M. (2018). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Origanum vulgare* subsp. *viride* Essential Oils

- Cultivated in Two Different Regions of Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(4), 1062–1075.
- Mejri, H., Khetatfa, T., Aidi Wannes, W., Smaoui, A., & Saidani Tounsi, M. (2022). Histochemistry, chemical composition and antioxidant activity of *Citrus aurantium* L. essential oil during leaf development. *Journal of Essential Oil Research*, 34(4), 329–338.
- Mello, V. G., Escudeiro, H., Weckwerth, A. C. V. B., Andrade, M. I., Fusaro, A. E., de Moraes, E. B., Ruiz, L. da S., & Baptista, I. M. F. D. (2021). Virulence Factors and Antifungal Susceptibility in *Candida* Species Isolated from Dermatomycosis Patients. *Mycopathologia*, 186(1), 71–80.
- Mhiri, R., Azoulay, S., Fernandez, X., Michel, T., & Allouche, N. (2024). Tyrosinase, Elastase, Lipoyxygenase Inhibition Activities and chemical composition of essential oils from *Menthaspicata*, *Thymus vulgaris*, *Citrus aurantium* and *Juniperusphoenica* from Tunisia. *Chemistry Africa*, 7(6), 3059–3066.
- Micucci, M., Protti, M., Aldini, R., Frosini, M., Corazza, I., Marzetti, C., Mattioli, L. B., Tocci, G., Chiarini, A., Mercolini, L., & Budriesi, R. (2020). *Thymus vulgaris* L. Essential Oil Solid Formulation: Chemical Profile and Spasmolytic and Antimicrobial Effects. *Biomolecules*, 10(6), 860.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Jovanović, V. S., Mitić, V., Stojanović-Radić, Z., & Zlatković, B. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidative and anticholinesterase activity of *Satureja montana* L. ssp. *montana* essential oil. *Central European Journal of Biology*, 9(7), 668–677.
- Mihaylova, Y., Ermenlieva, N., Stamova, S., & Mihaylova, S. (2022). In vitro study of antimicrobial activity of commercial essential oils of the Lamiaceae family against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231. *Proceed of CBU Nat Sci ICT*, 3, 8–11.
- Miranda-Cadena, K., Marcos-Arias, C., Mateo, E., Aguirre-Urizar, J. M., Quindós, G., & Eraso, E. (2021). In vitro activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112218.

- Moazeni, M., Davari, A., Shabanzadeh, S., Akhtari, J., Saeedi, M., Mortyeza-Semnani, K., Abastabar, M., Nabili, M., Moghadam, F. H., Roohi, B., Kelidari, H., & Nokhodchi, A. (2021). In vitro antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil nanoemulsion. *Journal of Herbal Medicine*, 28, 100452.
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2020). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* Grown in Iran against Some Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(5), 1072–1083.
- Moghrovyan, A., Sahakyan, N., Babayan, A., Chichoyan, N., Petrosyan, M., & Trchounian, A. (2019). Essential Oil and Ethanol Extract of Oregano (*Origanum vulgare* L.) from Armenian Flora as a Natural Source of Terpenes, Flavonoids and other Phytochemicals with Antiradical, Antioxidant, Metal Chelating, Tyrosinase Inhibitory and Antibacterial Activity. *Current Pharmaceutical Design*, 25(16), 1809–1816.
- Mohammed, I. O., Alrasheid, A. A., & Hussein Ayoub, S. M. (2024). GC-MS Analysis and Study of the Antimicrobial Activity of *Citrus paradisi*, *Citrus aurantifolia*, and *Citrus sinensis* Peel Essential Oils as Hand Sanitizer. *International Journal of Microbiology*, 2024(1), 4957712.
- Mohandas, V., & Ballal, M. (2011). Distribution of *Candida* Species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in Southern India. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(1), 4–8.
- Moisa, C., Copolovici, L., Pop, G., Lupitu, A., Ciutina, V., & Copolovici, D. (2018). Essential oil composition, total phenolic content, and antioxidant activity-determined from leaves, flowers and stems of *Origanum vulgare* L. var. *aureum*. *Agriculture for Life, Life for Agriculture” Conference Proceedings*, 1(1), 555–561.
- Mollova, S., Fidan, H., Antonova, D., Bozhilov, D., Stanev, S., Kostova, I., & Stoyanova, A. (2020). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subspecies essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44(4), 371–378.
- Moradi, M., Hassani, A., Sefidkon, F., & Maroofi, H. (2021). Qualitative and Quantitative Changes in the Essential Oil of *Origanum vulgare* ssp. *gracile* as Affected by Different

- Harvesting Times. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 23(1), 179–186.
- Moreira Da Silva, T., Pinheiro, C. D., Puccinelli Orlandi, P., Pinheiro, C. C., & Soares Pontes, G. (2018). Zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) smith: A potential prophylactic and therapeutic agent against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 301.
- Morshedloo, M. R., Craker, L. E., Salami, A., Nazeri, V., Sang, H., & Maggi, F. (2017). Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono- and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 119–128.
- Morshedloo, M. R., Mumivand, H., Craker, L. E., & Maggi, F. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils in *Origanum vulgare* subsp. *gracile* at different phenological stages and plant parts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), e13516.
- Mounchid, K., Bourjilat, F., Dersi, N., Aboussaouira, T., Rachidai, A., Tantaoui-Elaraki, A., & Alaoui-Ismaili, M. (2005). The susceptibility of *Escherichia coli* strains to essential oils of *Romarinus officinalis* and *Eucalyptus globulus*. *African Journal of Biotechnology*, 4(10), 1175–1176.
- Najar, B., Pistelli, L., Ferri, B., Angelini, L. G., Tavarini, S., Stochmal, A., Zuchowski, J. ', Kozachok, S., Pérez, A. J., & Pecio, Ł. (2021). Crop Yield and Essential Oil Composition of Two *Thymus vulgaris* Chemotypes along Three Years of Organic Cultivation in a Hilly Area of Central Italy. *Molecules*, 26(16), 5109.
- Napoli, E., Giovino, A., Carrubba, A., Siong, V. H. Y., Rinoldo, C., Nina, O., & Ruberto, G. (2020). Variations of Essential Oil Constituents in Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *viridulum* (*O. heracleoticum*) over Cultivation Cycles. *Plants*, 9(9), 1174.
- Narang, N., & Jiraungkoorskul, W. (2016). Anticancer Activity of Key Lime, *Citrus aurantifolia*. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), 118.
- Neves, N. A., Carvalho, L. P., De Oliveira, M. A. M., Giraldo, P. C., Bacellar, O., Cruz, Á. A., &

- Carvalho, E. M. (2005). Association between atopy and recurrent vaginal candidiasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 142(1), 167–171.
- Ngongang, M. D. T., Eke, P., Sameza, M. L., Mback, M. N. L. N., Djiéto-Lordon, C., & Boyom, F. F. (2022). Chemical constituents of essential oils from *Thymus vulgaris* and *Cymbopogon citratus* and their insecticidal potential against the tomato borer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(1), 31–43.
- Nidhi, P., Rolta, R., Kumar, V., Dev, K., & Sourirajan, A. (2020). Synergistic potential of *Citrus aurantium* L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 262, 113135.
- Nikolić, M., Jovanović, K. K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products*, 61, 225–232.
- Ninčević, T., Grdiša, M., Šatović, Z., & Jug-Dujaković, M. (2019). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. *Industrial Crops and Products*, 138, 111487.
- NIST Mass Spectrometry Data Center, William E. Wallace, R. I. (n.d.). “Retention Indices.” *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology Gaithersburg MD, 20899.
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 71–92.
- Oksuz, S., Sahin, I., Yildirim, M., Gulcan, A., Yavuz, T., Kaya, D., & Koc, A. N. (2007). Phospholipase and Proteinase Activities in Different *Candida* Species Isolated from Anatomically Distinct Sites of Healthy Adults. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60(5), 280–283.
- Okunowo, W. O., Oyedeji, O., Afolabi, L. O., & Matanmi, E. (2013). Essential Oil of Grape Fruit (*Citrus paradisi*) Peels and Its Antimicrobial Activities. *American Journal of Plant Sciences*, 2013(07), 1–9.

- Oliva, A., Garzoli, S., Sabatino, M., Tadić, V., Costantini, S., Ragno, R., & Božović, M. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. *Natural Product Research*, 34(3), 445–448.
- Oliveira, S. A. C., Zambrana, J. R. M., Di Iorio, F. B. R., Pereira, C. A., & Jorge, A. O. C. (2013). The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms. *Brazilian Oral Research*, 28(1), 22–27.
- Orchard, A., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2019). Commercial Essential Oil Combinations against Topical Fungal Pathogens. *Natural Product Communications*, 14(1), 151–158.
- Oskay, M., Sarikurkcu, C., Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178–184.
- Ouedrhiri, W., Bouhdid, S., Balouiri, M., El, A., Lalami, O., Moja, S., Chahdi, F. O., & Greche, H. (2015). Chemical composition of *Citrus aurantium* L. leaves and zest essential oils, their antioxidant, antibacterial single and combined effects. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1), 78–84.
- Oulebsir, C., Mefti-Korteby, H., Djazouli, Z. E., Zebib, B., & Merah, O. (2022). Essential Oil of *Citrus aurantium* L. Leaves: Composition, Antioxidant Activity, Elastase and Collagenase Inhibition. *Agronomy*, 12(6), 1466.
- Özer, Z., Kiliç, T., Selvi, S., & Pasa, C. (2018). Effect of Different Drying Methods and Development Stages on the Essential Oil Chemical Composition of Aerial Parts of *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (link) Letsw. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 21(5), 1403–1409.
- Palazzolo, E., Laudicina, V. A., & Germanà, M. A. (2013). Current and Potential Use of *Citrus* Essential Oils. *Current Organic Chemistry*, 17, 3042–3049.
- Pandur, E., Micalizzi, G., Mondello, L., Horváth, A., Sipos, K., & Horváth, G. (2022). Antioxidant

- and Anti-Inflammatory Effects of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oils Prepared at Different Plant Phenophases on *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Activated THP-1 Macrophages. *Antioxidants*, 11(7), 1330.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), e1–e50.
- Paw, M., Begum, T., Gogoi, R., Pandey, S. K., & Lal, M. (2020). Chemical Composition of *Citrus limon* L. Burmf Peel Essential Oil from North East India. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 23(2), 337–344.
- Pedroso, R. D. S., Balbino, B. L., Andrade, G., Dias, M. C. P. S., Alvarenga, T. A., Pedroso, R. C. N., Pimenta, L. P., Lucarini, R., Pauletti, P. M., Januário, A. H., Carvalho, M. T. M., Miranda, M. L. D., & Pires, R. H. (2019). In Vitro and In Vivo Anti-*Candida* spp. Activity of Plant-Derived Products. *Plants*, 8(11), 494.
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., Genčić, M., Dimitrijević, M., & Radulović, N. (2020). Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of biofilm formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food and Chemical Toxicology*, 141, 111431.
- Perić, M., Rajković, K., Milić Lemić, A., Živković, R., & Arsić Arsenijević, V. (2019). Development and validation of mathematical models for testing antifungal activity of different essential oils against *Candida* species. *Archives of Oral Biology*, 98, 258–264.
- Permadi, N., Nurzaman, M., Doni, F., & Julaeha, E. (2024). Elucidation of the composition, antioxidant, and antimicrobial properties of essential oil and extract from *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle peel. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 31(6), 103987.
- Petkova, N., Vrancheva, R., Mihaylova, D., Ivanov, I., Pavlov, A., Denev, P., & Petkova, N. T. (2015). Antioxidant activity and fructan content in root extracts from elecampane (*Inula helenium* L.). *Journal of BioScience Biotechnology*, 4(1), 101–107.

- Petretto, G. L., Vacca, G., Addis, R., Pintore, G., Nieddu, M., Piras, F., Sogos, V., Fancello, F., Zara, S., & Rosa, A. (2023). Waste *Citrus limon* Leaves as Source of Essential Oil Rich in Limonene and Citral: Chemical Characterization, Antimicrobial and Antioxidant Properties, and Effects on Cancer Cell Viability. *Antioxidants*, 12(6), 1238.
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58(11), 1454–1462.
- Plata-Rueda, A., Santos, M. H. Dos, Serrão, J. E., & Martínez, L. C. (2022). Chemical Composition and Insecticidal Properties of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) Essential Oil against the Stored Product Beetle, *Sitophilus granarius*. *Agronomy*, 12(9), 2204.
- Plata-Rueda, A., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E., & Martínez, L. C. (2021). *Origanum vulgare* essential oil against *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): Composition, insecticidal activity, and behavioral response. *Plants*, 10(11), 2513.
- Pokajewicz, K., Shanaida, M., Hudz, N., Svydenko, L., Yezerska, O., Wieczorek, P. P., & Lipok, J. M. (2023). GC-MS evaluation of the essential oils from the newly developed cultivars of *Satureja montana* grown in Southern Ukraine. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 80(4), 591–601.
- Porte, A., & Godoy, R. L. O. (2008). Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (thyme) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *Brazil. Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(3), 307–310.
- Potente, G., Bonvicini, F., Gentilomi, G. A., & Antognoni, F. (2020). Anti-*Candida* Activity of Essential Oils from Lamiaceae Plants from the Mediterranean Area and the Middle East. *Antibiotics*, 9(7), 395.
- Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 20(1), 7–14.
- Proškovcová, M., Čonková, E., Váczi, P., Harčárová, M., & Malinovská, M. (2021). Antibiofilm activity of selected plant essential oils from the Lamiaceae family against *Candida albicans*

- clinical isolates. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 28(2), 260–266.
- Qiao, Y., Yu, Z., Bai, L., Li, H., Zhang, S., Liu, J., Gao, Z., & Yang, X. (2021). Chemical composition of essential oils from *Thymus mongolicus*, *Cinnamomum verum*, and *Origanum vulgare* and their acaricidal effects on *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 224, 112672.
- Raffo, A., Sapienza, F. U., Astolfi, R., Lombardi, G., Frascchetti, C., Božović, M., Artini, M., Papa, R., Trecca, M., Fiorentino, S., Vecchiarelli, V., Papalini, C., Selan, L., & Ragno, R. (2023). Effect of Different Soil Treatments on Production and Chemical Composition of Essential Oils Extracted from *Foeniculum vulgare* Mill., *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L. *Plants*, 12(15), 2835.
- Rai, L. S., van Wijlick, L., Chauvel, M., d'Enfert, C., Legrand, M., & Bachellier-Bassi, S. (2022). Overexpression approaches to advance understanding of *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 117(3), 589–599.
- Rana, G. M. M., Uddin, M. J., Barmon, J., Ghos, B. C., Chowdhury, T. A., Dey, A. K., Maitra, B., Tamanna, I. M., Rahman, A. M., Saha, B. K., & Yeasmin, M. S. (2025). Assessment of the essential oil extracted from *Citrus aurantifolia* leaves using solvent-free microwave extraction technique. *Food Chemistry Advances*, 6, 100913.
- Rao Kurma, S., & Mishra, S. H. (1997). Screening of anti-inflammatory and hepatoprotective activities of alantolactone, isolated from the roots of *Inula racemosa*. *Indian Drug*, 34(10), 571–575.
- Ribeiro, R., Fernandes, L., Costa, R., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Henriques, M., & Rodrigues, M. E. (2022). Comparing the effect of *Thymus* spp. essential oils on *Candida auris*. *Industrial Crops and Products*, 178, 114667.
- Rodríguez-Cerdeira, C., Gregorio, M. C., Molares-Vila, A., López-Barcenas, A., Fabbrocini, G., Bardhi, B., Sinani, A., Sánchez-Blanco, E., Arenas-Guzmán, R., & Hernandez-Castro, R. (2019). Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 110–125.

- Rosa, A., Deiana, M., Atzeri, A., Corona, G., Incani, A., Melis, M. P., Appendino, G., & Dessì, M. A. (2007). Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated α -pyrone–phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chemico-Biological Interactions*, 165(2), 117–126.
- Rosato, A., Altini, E., Sblano, S., Salvagno, L., Maggi, F., de Michele, G., Carocci, A., Clodoveo, M. L., Corbo, F., & Fracchiolla, G. (2021). Synergistic Activity of New Diclofenac and Essential Oils Combinations against Different *Candida* spp. *Antibiotics*, 10(6), 688.
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., & Mallamaci, R. (2008). The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 15, 635–638.
- Rosato, A., Vitali, C., Piarulli, M., Mazzotta, M., Argentieri, M. P., & Mallamaci, R. (2009). In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine*, 16, 972–975.
- Rus, C. F., Alexa, E., Sumalan, R. M., Galuscan, A., Dumitrache, A., Imbrea, I. M., Sarac, I., Pag, A., & Pop, G. (2016). Antifungal activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. Essential oil. *Revista de Chimie*, 67(11), 2287–2290.
- Rusenova, N., & Parvanov, P. (2009). Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences*, 7(1), 37–43.
- Saeb, S., Amin, M., Gooybari, R. S., & Aghel, N. (2016). Evaluation of Antibacterial Activities of *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, and *Citrus grandis* Against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Enteric Pathogens*, 4(4), e37103.
- Sachivkina, N., Podoprighora, I., & Bokov, D. (2021). Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. *Veterinary World*, 14(6), 1608.
- Safaeian Laein, S., Salari, A., Shahsavani, D., & Haghishani, H. (2021). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of essential oil of lime (*Citrus aurantifolia*) pomace powder.

Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 40(3), 832–840.

- Saffarian, H., Rahimi, E., Khamesipour, F., & Hashemi Dehkordi, S. M. (2024). Antioxidant and antimicrobial effect of sodium alginate nanoemulsion coating enriched with oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.) and *Trachyspermum ammi* oil (*Carum cupticum*) on food pathogenic bacteria. *Food Science & Nutrition*, 12(4), 2985–2997.
- Saharkhiz, M., Motamedi, M., Zomorodian, K., Pakshir, K., Miri, K., & Hemyari, K. (2012). Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. *International Scholarly Research Notices*, 2012, 1–6.
- Said-Al Ahl, H. A. H., Kačániova, M., Mahmoud, A. A., Hikal, W. M., Čmíková, N., Szczepanek, M., Błaszczyk, K., Al-Balawi, S. M., Bianchi, A., Smaoui, S., & Tkachenko, K. G. (2024). Phytochemical Characterization and Biological Activities of Essential Oil from *Satureja montana* L., a Medicinal Plant Grown under the Influence of Fertilization and Planting Dates. *Biology*, 13(5), 328.
- Sajid, R., Abbas, Z., Nazir, M., Saleem, M., Riaz, N., Tousif, M. I., Tauseef, S., Zengin, G., Uba, A. I., Hussain, A. I., Ali, M. S., Hashem, A., Almutairi, K. F., Avila-Quezada, G. D., & Abd_Allah, E. F. (2024). Valorization of hydro-distillate of fruit peels of *Citrus paradisi* macfad. Cultivar. Foster: Chemical profiling, antioxidant evaluation and in vitro and in silico enzyme inhibition studies. *Heliyon*, 10(17).
- Sala, A., Recio, M. C., Schinella, G. R., Máñez, S., Giner, R. M., & Ríos, J. L. (2003). A new dual inhibitor of arachidonate metabolism isolated from *Helichrysum italicum*. *European Journal of Pharmacology*, 460(2–3), 219–226.
- Saltan, N., Köse, Y. B., Göger, F., & İşcan, G. (2022). Phenolic profile, antioxidant and anticandidal activities of *Inula oculus-christi* L. from Turkey. *Journal of Research in Pharmacy*, 26(4), 799–808.
- Samaranayake, Y. H., Dassanayake, R. S., Jayatilake, J. A. M. S., Cheung, B. P. K., Yau, J. Y. Y., Yeung, K. W. S., & Samaranayake, L. P. (2005). Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Medical Microbiology*, 54(6), 583–593.

- Santos, J. D. C., Coelho, E., Silva, R., Passos, C. P., Teixeira, P., Henriques, I., & Coimbra, M. A. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* by products essential oils. *Industrial Crops and Products*, 137, 541–548.
- Saoudi, B., Bariz, K., Saci, S., Belounis, Y., Ait Issad, H., Abbaci, M., Mustapha, M. A., Nabti, E. H., Alenazy, R., Alhussaini, M. S., Alyahya, A. A. I., Alqasmi, M., Alhumaidi, M. S., Almufarriji, F. M., & Houali, K. (2024). Enhancing Antibiotic Efficacy and Combating Biofilm Formation: Evaluating the Synergistic Potential of *Origanum vulgare* Essential Oil against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Microorganisms*, 12(8), 1651.
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10–24.
- Sarikurkcü, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178–184.
- Sateriale, D., Forgione, G., De Cristofaro, G. A., Facchiano, S., Boscaino, F., Pagliuca, C., Colicchio, R., Salvatore, P., Paolucci, M., & Pagliarulo, C. (2022). Towards Green Strategies of Food Security: Antibacterial Synergy of Essential Oils from *Thymus vulgaris* and *Syzygium aromaticum* to Inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Pathogenic Food Isolates. *Microorganisms*, 10(12), 2446.
- Sawant, B., & Khan, T. (2017). Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 1478–1490.
- Schillaci, D., Arizza, V., Dayton, T., Camarda, L., & Di Stefano, V. (2008). In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. *oleogum* resin essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 433–438.
- Seca, A. M. L., Grigore, A., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2014). The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. *Journal of*

- Ethnopharmacology*, 154, 286–310.
- Sen, A., Kurkcuoglu, M., Senkardes, I., Bitis, L., & Baser, K. H. C. (2019). Chemical Composition, Antidiabetic, Anti-inflammatory and Antioxidant Activity of *Inula ensifolia* L. Essential Oil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(4), 1048–1057.
- Servi, E., & Servi, H. (2022). Chemical composition and antibacterial activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don commercial essential oil from Serbia. *Natural Products and Biotechnology*, 2(1), 14–22.
- Sevindik, E., Aydın, S., Sujka, M., Apaydın, E., Yıldırım, K., & Palas, G. (2021). GC-MS Analysis and Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils Extracted From Fruit Peel of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) Grown in the West Anatolian Area. *Erwerbs-Obstbau*, 63(2), 135–142.
- Sharififard, M., Alizadeh, I., Jahanifard, E., Wang, C., & Azemi, M. E. (2018). Chemical Composition and Repellency of *Origanum vulgare* Essential Oil against *Cimex lectularius* under Laboratory Conditions. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 12(4), 387.
- Sharifzadeh, A., Khosravi, A. R., & Ahmadian, S. (2016). Chemical composition and antifungal activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against planktonic and biofilm growth of *Candida albicans* isolates from buccal lesions of HIV+ individuals. *Microbial Pathogenesis*, 96, 1–9.
- Shafiee-Hajiabad, M., Hardt, M., & Honermeier, B. (2014). Comparative investigation about the trichome morphology of Common oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*) and Greek oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(2), 50-58.
- Sheikhi, R., Rafat, Z., Roostaei, D., Sharifi, N., Neshandar Asli, H., & Naseri, R. (2023). Antimicrobial Activity of Traditional Medicinal Plant Extracts against Bacterial and Fungal Strains Causing Dental Caries: An in Vitro Study. *Infection Epidemiology and Microbiology*, 9(3), 139–248.
- Shirkhani, S., Sepahvand, A., Mirzaee, M., & Anbari, K. (2016). Phospholipase and proteinase

- activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. *Journal de Mycologie Medicale*, 26, 255–260.
- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D., Mendonç, D. I., & Domingues, F. C. (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 19, 42–47.
- Silva, S. L., Araújo, F. S. M., Silva, P. O. A., Silva, E. V. A., Bezerra, M. M. S. L., Diniz, A. F., Oliveira, D. M., Jesus, H. O., Nascimento-Junior, B. B., Medeiros, L. A. D. M., & Oliveira-Filho, A. A. (2023). Evaluation of the antimicrobial effect of the *Origanum vulgare* L. essential oil on strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Brazilian Journal of Biology*, 83, e269317.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1734–1740.
- Sotelo, J. P., Oddino, C., Giordano, D. F., Carezzano, M. E., & Oliva, M. de las M. (2021). Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on soybeans seeds infected with *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 116, 101735.
- Soulaimani, B., Nafis, A., Kasrati, A., Rochdi, A., Mezrioui, N., Abbad, A., & Hassani, L. (2019). Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic potential of essential oil from endemic *Lavandula maroccana* (Mill.). *South African Journal of Botany*, 125, 202–206.
- Soulaimani, Bouchra, Varoni, E., Iriti, M., Mezrioui, N. E., Hassani, L., & Abbad, A. (2021). Synergistic Anticandidal Effects of Six Essential Oils in Combination with Fluconazole or Amphotericin B against Four Clinically Isolated *Candida* Strains. *Antibiotics*, 10(9), 1049.
- Šovljanski, O., Aćimović, M., Tomić, A., Lončar, B., Miljković, A., Čabarkapa, I., & Pezo, L. (2024). Antibacterial and Antifungal Potential of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Essential Oil. *Antibiotics*, 13(8), 722.
- Spiridon, I., Nechita, C. B., Niculaua, M., Silion, M., Armatu, A., Teacă, C. A., & Bodîrlău, R. (2013). Antioxidant and chemical properties of *Inula helenium* root extracts. *Central*

- Spiridonov, N. A., Konovalov, D. A., & Arkhipov, V. V. (2005). Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. *Phytotherapy Research*, 19(5), 428–432.
- Spyridopoulou, K., Fitsiou, E., Bouloukosta, E., Tiptiri-Kourpeti, A., Vamvakias, M., Oreopoulou, A., Papavassilopoulou, E., Pappa, A., & Chlichlia, K. (2019). Extraction, Chemical Composition, and Anticancer Potential of *Origanum onites* L. Essential Oil. *Molecules*, 24(14), 2612.
- Staicu, V., Tomescu, J. A., Neagu, M., Popescu, A., Popescu, M., Manea, C., & Călinescu, I. (2023). Ultrasonic-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Elecampagne (*Inula helenium*, Radix Inulae). *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences*, 4(8), 1185–1193.
- Staver, M. M., Gobin, I., Ratkaj, I., Petrovic, M., Vulinovic, A., Dinarina-Sablic, M., & Broznic, D. (2018). In vitro Antiproliferative and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Flowers and Leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Growing in Central Dalmatia (Croatia). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(1), 77–91.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899.
- Stešević, D., Jaćimović, Ž., Šatović, Z., Šapčanin, A., Jančan, G., Kosović, M., & Damjanović-Vratnica, B. (2018). Chemical Characterization of Wild Growing *Origanum vulgare* Populations in Montenegro. *Natural Product Communications*, 13(10), 1357–1362.
- Stojakowska, A., Malarz, J., & Kisiel, W. (2004). Thymol Derivatives from a Root Culture of *Inula helenium*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 59(7–8), 606–608.
- Stojanović-Radić, Z., Čomić, L., Radulović, N., Blagojević, P., Denić, M., Miltojević, A., Rajković, J., & Mihajilov-Krstev, T. (2012). Antistaphylococcal activity of *Inula helenium* L. root essential oil: Eudesmane sesquiterpene lactones induce cell membrane damage.

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 31(6), 1015–1025.

- Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Stojanović, N., Sharifi-Rad, J., & Stanković, N. (2016). Potential of *Ocimum basilicum* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against biofilms of *P. aeruginosa* clinical isolates. *Cellular and Molecular Biology*, 62(9), 27–33.
- Stojanović, P., Stojanović, N., Stojanović-Radić, Z., Arsenijević, V. A., Otašević, S., Randjelović, P., & Radulović, N. S. (2016). Surveillance and characterization of *Candida* bloodstream infections in a Serbian tertiary care hospital. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(6), 643–656.
- Stringaro, A., Vavala, E., Colone, M., Pepi, F., Mignogna, G., Garzoli, S., Cecchetti, S., Ragno, R., & Angiolella, L. (2014). Effects of *Mentha suaveolens* essential oil alone or in combination with other drugs in *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–9.
- Sudjana, A. N., Carson, C. F., Carson, K. C., Riley, T. V., & Hammer, K. A. (2012). *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. *Medical Mycology*, 50(8), 863–870.
- Suntar, I., Khan, H., Patel, S., Celano, R., & Rastrelli, L. (2018). An Overview on *Citrus aurantium* L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(1).
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 79.
- Talić, S., Odak, I., Bevanda, A. M., Crnjac, N., & Paštar, M. (2019). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* from Herzegovina: Volatile Composition, Variations during Seasons, Total Polyphenols, Acetylcho-linesterase Inhibition and Antioxidant Activity. *Croatica Chemica Acta*, 92(1), 69–77.
- Tan, R. X., Tang, H. Q., Hu, J., & Shuai, B. (1998). Lignans and sesquiterpene lactones from

- Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. *Phytochemistry*, 49(1), 157–161.
- Tanasescu, S., Nitu, R., Dahma, G., Pilut, C., Diaconu, M., Neagoe, O., Muntean, D., Horhat, I., Dragomir, A., Lighezan, D., & Dobrescu, A. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Romanian *Origanum vulgare*. *Revista de Chimie*, 70(5), 1744–1745.
- Tapiero, J., Salamanca, G., Marín, C., & Tolima, U. (2019). Analysis of volatile compounds and antioxidant activity of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.). *Advancement in Medicinal Plant Research*, 7, 54–60.
- Tavallali, H., Bahmanzadegan, A., Rowshan, H., & Tavallali, V. (2021). Essential Oil Composition, Antioxidant Activity, Phenolic Compounds, Total Phenolic and Flavonoid Contents from Pomace of *Citrus aurantifolia*. *Journal of Medicinal Plants and By-Products*, 10(Special), 103–116.
- Taweekhaisupapong, S., Aieamsaard, J., Chitropas, P., & Khunkitti, W. (2012). Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on *Candida* biofilm and germ tube formation. *South African Journal of Botany*, 81, 95–102.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2707–2714.
- Tejada-Muñoz, S., Cortez, D., Rascón, J., Chavez, S. G., Caetano, A. C., Díaz-Manchay, R. J., Sandoval-Bances, J., Huyhua-Gutierrez, S., Gonzales, L., Chenet, S. M., & Tapia-Limonchi, R. (2024). Antimicrobial Activity of *Origanum vulgare* Essential Oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Pharmaceuticals*, 17(11), 1430.
- Teles, A. M., Rosa, T. D. D. S., Mouchrek, A. N., Abreu-Silva, A. L., Da Silva Calabrese, K., & Almeida-Souza, F. (2019). *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, and *Curcuma longa* Essential Oils: Chemical Composition, Antimicrobial and Antileishmanial Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019(1), 2421695.
- Thonglem, S., Khumweera, P., & Lahpun, N. (2023). GC-MS Analysis, Antioxidant Activity and

- Antimicrobial Activity of Kaffir Lime (*Citrus hystrix* DC.) and Key Lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle.) Peel Essential Oils. *Journal of Current Science and Technology*, 13(3), 620–629.
- Tomanić, D., Božin, B., Kladar, N., Stanojević, J., Čabarkapa, I., Stilinović, N., Apić, J., Božić, D. D., & Kovačević, Z. (2022). Environmental Bovine Mastitis Pathogens: Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Sensitivity to *Thymus vulgaris* L., *Thymus serpyllum* L., and *Origanum vulgare* L. Essential Oils. *Antibiotics*, 11(8), 1077.
- Tomičić, Z. M., Tomičić, R. M., Kocić Tanackov, S. D., & Raspor, P. (2022). Essential oils as antimicrobial and anti-adhesion agents against bacteria *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*, and yeasts *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Feed Research*, 49(2), 107–115.
- Tosun, F., Kizilay, Ç. A., Şener, B., & Vural, M. (2005). The evaluation of plants from Turkey for in Vitro antimycobacterial activity. *Pharmaceutical Biology*, 43(1), 58–63.
- Touil, H. F. Z., Boucherit, K., Boucherit-Otmani, Z., Kohder, G., Madkour, M., & Soliman, S. S. M. (2020). Optimum Inhibition of Amphotericin-B-Resistant *Candida albicans* Strain in Single- and Mixed-Species Biofilms by *Candida* and Non-*Candida* Terpenoids. *Biomolecules*, 10(2), 342.
- Tsang, C. S. P., Chu, F. C. S., Leung, W. K., Jin, L. J., Samaranayake, L. P., & Siu, S. C. (2007). Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medical Microbiology*, 56(10), 1393–1398.
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018.
- Tzanova, M., Grozeva, N., Gerdzhikova, M., Atanasov, V., Terzieva, S., & Prodanova, R. (2018). Biochemical composition of essential oil of Corsican *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, introduced and cultivated in South Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24(6), 1071–1077.

- Uahomo, P. O., Kpaduwa, S., Daniel, C., & Ezerioha, C. E. (2023). Characterization and Comparative Assessment of the Essential Oil from Lime (*Citrus aurantifolia*) Exocarp Using Maceration and Soxhlet Extraction Methods. *Scholars International Journal of Chemistry and Material Sciences*, 6(06), 126–134.
- Ugbabe Grace, E., Aliyu, A., Okhale Samuel, E., & Igura Paul, A. (2019). Comparative studies of essential oil of fruit peels of four citrus species (family: Rutaceae) in Nigeria. *International Journal of Chemical Studies*, 7(6), 2742–2747.
- Váczi, P., Proškovcová, M., Čonková, E., Marcinčáková, D., Bačkorová, M., & Harčárová, M. (2024). Essential oil and plant extract of oregano as agents influencing the virulence factors of *Candida albicans*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 25–33.
- Vahedi, G., Khosravi, A., Shokri, H., Moosavi, Z., Delirez, N., Sharifzadeh, A., Barin, A., Shahrokh, S., & Balal, A. (2016). Fungicidal effect of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida glabrata* and its cytotoxicity against macrophages. *Journal of Herbmед Pharmacology*, 5(2), 78–84.
- Valizadeh, S., Fakheri, T., Mahmoudi, R., Katiraei, F., & Gajarbeygi, P. (2014). Evaluation of Antioxidant, Antibacterial, and Antifungal Properties of *Satureja hortensis* Essential Oil. *Biotechnology and Health Sciences*, 1(3), 24733.
- Vazirian, M., Mohammadi, M., Farzaei, M. H., Amin, G., & Amanzadeh, Y. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2(1), 41–46.
- Viegas, D. A., Palmeira-De-Oliveira, A., Salgueiro, L., Martinez-De-Oliveira, J., & Palmeira-De-Oliveira, R. (2014). *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 54–65.
- Vikrant, P., Priya, J., & Nirichan, K. B. (2015). Plants with anti-*Candida* activity and their mechanism of action: a review. *Journal of Environmental Research And Development*, 9(04), 1189–1196.
- Vukić, M., Branković, J., & Ristić, M. (2023). Chemical composition and biological effects of

- Citrus aurantium* var. *dulce* essential oil. *Acta Horticulturae et Regiotecturae*, 26(1), 14–20.
- Wahab, S., Tandon, R., Jacob, Z., & Soc, P. S. (1981). In vitro activity of a phytochemical, alantolactone from *Inula racemosa* Hook. f. against some pathogenic and opportunistic fungi. *Journal of the Indian Botanical Society*, 60(3/4), 278–281.
- Wang, C. M., Jia, Z. N., & Zheng, R. L. (2007). The effect of 17 sesquiterpenes on cell viability and telomerase activity in the human ovarian cancer cell line HO-8910. *Planta Medica*, 73(2), 180–184.
- Wang, Q., Gao, S., Wu, G. Z., Yang, N., Zu, X. P., Li, W. C., Xie, N., Zhang, R. R., Li, C. W., Hu, Z. L., & Zhang, W. D. (2018). Total sesquiterpene lactones isolated from *Inula helenium* L. attenuates 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Phytomedicine*, 46, 78–84.
- Węglarz, Z., Kosakowska, O., Pióro-Jabrucka, E., Przybył, J. L., Gniewosz, M., Kraśniewska, K., Szyndel, M. S., Costa, R., & Bączek, K. B. (2022). Antioxidant and Antibacterial Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. from Central Europe. *Pharmaceuticals*, 15(6), 735.
- Wei, W., Yang, H., Hu, L., Ye, Y., & Li, J. (2017). Activity of levofloxacin in combination with colistin against *Acinetobacter baumannii*: In vitro and in a *Galleria mellonella* model. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(6), 821–830.
- Wesołowska, A., & Jadcak, D. (2019). Comparison of the Chemical Composition of Essential Oils Isolated from Two Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3), 829–835.
- Wu, P., Tang, X., Jian, R., Li, J., Lin, M., Dai, H., Wang, K., Sheng, Z., Chen, B., Xu, X., Li, C., Lin, Z., Zhang, Q., Zheng, X., Zhang, K., Li, D., & Hong, W. D. (2021). Chemical Composition, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Essential Oils of Discarded Perfume Lemon and Leaves (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) as Possible Sources of Functional Botanical Agents. *Frontiers in Chemistry*, 9, 679116.
- Yang, L., Zhong, L., Ma, Z., Sui, Y., Xie, J., Liu, X., & Ma, T. (2022). Antifungal effects of alantolactone on *Candida albicans*: An in vitro study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149,

112814.

- Zanotto, A. W., Kanemaru, M. Y. S., de Souza, F. G., Duarte, M. C. T., de Andrade, C. J., & Pastore, G. M. (2023). Enhanced antimicrobial and antioxidant capacity of *Thymus vulgaris*, *Lippia sidoides*, and *Cymbopogon citratus* emulsions when combined with mannosylerythritol a lipid biosurfactant. *Food Research International*, 163, 112213.
- Zheljazkov, V. D., Semerdjieva, I., Yankova-Tsvetkova, E., Astatkie, T., Stanev, S., Dincheva, I., & Kačániová, M. (2022). Chemical Profile and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. and *Helichrysum italicum* (Roth.) G. Don. *Plants*, 11(7), 951.
- Zinno, P., Guantario, B., Lombardi, G., Ranaldi, G., Finamore, A., Allegra, S., Mammano, M. M., Fascella, G., Raffo, A., & Roselli, M. (2023). Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from *Origanum vulgare* Genotypes Belonging to the Carvacrol and Thymol Chemotypes. *Plants*, 12(6), 1344.
- Žugić, A. R., Đorđević, S. M., Tadić, V. M., Arsić, I. A., & Mišić, D. R. (2013). Antimicrobial activities of elecampane root isolates. *Savremene Tehnologije*, 2(2), 54–58.

БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ

БИОГРАФИЈА

Марина (В.) Димитријевић рођена је 1992. године у Лесковцу, где је завршила основно и средње образовање. У средњој медицинској школи показује високо интересовање за биологију што је допринело да настави своје образовање на Универзитету у Нишу где уписује основне академске студије на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета. Након основних уписује и мастер студије које завршава 2016. године одбраном мастер рада на тему „Учесталост и резистенција бактеријских изолата из брисева рана“. Свој професионални пут наставља на докторским студијама које уписује школске 2016/2017. усмеравајући се на ужу научну област - Микробиологија. Све испите предвиђене планом и програмом докторских академских студија је положила у року са оценом 10.

У периоду од 2017. до 2020. године била је корисник стипендије за студенте докторских студија финансиране од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја. Као стипендиста била је укључена на пројекту под називом: „Комбинаторне библиотеке хетерогених катализатора, природних производа и њихових аналога: пут ка новим биолошки активним агенсима“ (ОИ 172061). Овај период је искористила за проширивање знања и стицање искуства кроз учествовање у припреми и реализацији лабораторијских вежби на предмету Медицинска микробиологија. Заснивањем радног односа као истраживач-приправник (2020. године) интензивира се њено ангажовање у настави. Од школске 2021/2022. године ангажована је на мастер студијама из више предмета, и то: Медицинска микробиологија, Методологија научно-истраживачког рада, Микробиологија хране и Молекуларна биологија прокариота. Паралелно са наставним ангажовањем уследило је напредовање у више звање истраживача-сарадника (2022. године).

Упоредо са професионалним развојем бави се лабораторијским радом и научном продукцијом. Резултати научно-истраживачког рада објављени су у еминентним научним часописима од којих више публикација у релевантним домаћим и међународним часописима укључујући оне индексиране на SCI и SCOPUS листама. Учествовала је на међународним и националним научним скуповима са којих има више објављених научних

саопштења штампаних у форми извода. Комплексан научно-истраживачки рад резултирао је повељом поводом Дана факултета, Природно-математичког у Нишу, као истраживач у две категорије: највише објављених научних радова у 2020. години. и најцитиранији аутор у 2020. години.

Значајно је истаћи њену посвећеност стручном усавршавању кроз семинаре и обуке, али и учешће у активностима значајним за Факултет и ширу заједницу. Учествовала је у организацији два научна скупа „14th Symposium on the Flora of Southerneastern Serbia and Neighbouring Regions“ који се одржао 2022. године у Кладову и „15th Symposium on the Flora of Southerneastern Serbia and Neighbouring Regions“ који се одржао 2025. године у Нишу. Такође, активно је учествовала у промовисању факултета и Департмана за биологију и екологију где се издваја учешће у пројекту „Пролећна школа природних наука“ (2022. година) и Школи Природно-математичких наука (2024. година).

БИБЛИОГРАФИЈА

Радови у међународним часописима изузетних вредности (M21a):

- Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Genčić, M., Pejčić, M., & Radulović, N. (2020). Anticandidal activity of *Inula helenium* root essential oil: Synergistic potential, anti-virulence efficacy and mechanism of action. *Industrial Crops and Products*, 149, 112373.
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., Genčić, M., **Dimitrijević, M.**, & Radulović, N. (2020). Antivirulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of biofilm formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food and Chemical Toxicology*, 141, 111431.
- Aksić, J., Genčić, M., Stojanović, N., Radulović, N., Zlatković, D., **Dimitrijević, M.**, Stojanović-Radić, Z., Srbljanović, J., Štajner, T., & Jovanović, Lj. (2023). New Iron Twist to Chloroquine-Upgrading Antimalarials with Immunomodulatory and Antimicrobial Features. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(3), 2084-2102.
- Aksić, J., Genčić, M., Radulović, N., **Dimitrijević, M.**, Stojanović-Radić, Z., Tomic, T., & Rodić, M. (2023). Bioisosteric ferrocenyl 1, 3-thiazolidine-4-carboxylic acid derivatives: In vitro antiproliferative and antimicrobial evaluations. *Bioorganic Chemistry*, 139, 106708.

Радови у врхунским међународним часописима (M21):

- Randelović, M., **Dimitrijević, M.**, Otašević, S., Stanojević, L., Išljamović, M., Ignjatović, A., Arsić Arsenijević, V., & Stojanović-Radić, Z. (2023). Antifungal activity and type of interaction of *Melissa officinalis* essential oil with antimycotics against biofilms of multidrug-resistant candida isolates from vulvovaginal mucosa. *Journal of Fungi*, 9(11), 1080.

Радови у истакнутим међународним часописима (M22):

- Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., **Dimitrijević, M.**, Aleksić, A., Anil Kumar, N., Salehi, B., William, C., & Sharifi-Rad, J. (2019). Piperine-A Major Principle of Black Pepper: A review of its bioactivity and studies. *Applied Sciences*, 9 (20), 4270.

- Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Aleksić, A., Neffe-Skocinska, K., Zielinska, D., Kolozyn-Krajewska, D., Salehi, B., Milton Prabu, S., Schutz, F., Oana Docea, A., Martins, N., & Calina, D. (2020). Probiotics: Versatile Bioactive Components in Promoting Human Health. *Medicina*, 56 (9), 433.
- Mitić, Z., Stojanović-Radić, Z., Cvetković, V., Jovanović, S., **Dimitrijević, M.**, Ickovski, J., Jovanović, N., Mihajilov-Krstev, T., & Stojanović, G. (2021). *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae): Volatile Profiles, Antimicrobial Activity and Toxicological Evaluation of Its Essential Oil. *Chemistry & Biodiversity*, 18 (9), e2100424.
- **Dimitrijević, M.**, Stojanović-Radić, Z., Radulović, N., & Nešić, M. (2025). Chemical Composition and Antifungal Effect of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., and *Satureja montana* L. Against Clinical Isolates of *Candida* spp. *Chemistry & Biodiversity*, e202500270.

Радови у међународним часописима (M23):

- Randelović, M., **Dimitrijević, M.**, Mijatović, S., Ignjatović, A., Arsić-Arsenijević, V., Stojanović-Radić, Z., Hay, R., & Otašević, S. (2024). Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* species—causative agents of female genital tract infections. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(4), 3863-3872.

Радови у истакнутим националним часописима (M51):

- Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Aleksić, A., & Stanković, N. (2021). Antistaphylococcal activity of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils: time-lapse kinetics, antibiofilm activity and synergistic potential. *Biologica Nyssana*, 12 (1), 33-45.
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, & Radulović, N. (2021). Antimicrobial efficacy of basil and sage essential oils against *Pseudomonas aeruginosa*: time-lapse kinetics and type of interaction with ciprofloxacin. *Biologica Nyssana*, 12 (1), 47-54.
- **Dimitrijević, M.**, Stojanović-Radić, Z., Radulović, N., Nešić, M., & Pejčić, M. (2025). Chemical composition and antifungal effect of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don against clinical isolates of *Candida* spp. *Biologica Nyssana*, 16, 1-12.

Радови у националним часописима (M53):

- Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Stanković, N., Aleksić, A., & Pejčić, M. (2016). Frequency Of Isolation And Antibiotic Resistance Patterns Of Bacterial Isolates From Wound Infections. *Biologica Nyssana*, 7 (2), 151-158.
- Stanković, N., Joković, N., Mihajilov Krstev, T., Pejčić, M., & **Dimitrijević, M.** (2017). Frequency and antibiotic resistance of bacteria in urinary tract infections in south Serbia. *Biologica Nyssana*, 8 (2), 137-144.

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34):

- Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Pejčić, M., Stanković, N., Genčić, M., Živković, M., & Radulović, N., Anticandidal activity of *Inula helenium* root essential oil: synergistic potential, anti-virulence efficacy, and mechanism of action. 49th International Symposium on Essential Oils, Niš, Serbia, 2018. Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology, 16 (1), 2018: 82.
- Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., **Dimitrijević, M.**, Stanković, N., Genčić, M., & Radulović, N., Inhibitory effects of *Ocimum basilicum* and *Salvia officinalis* essential oils on virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. 49th International Symposium on Essential Oils, Niš, Serbia, 2018. Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology, 16 (1), 2018: 43.
- **Dimitrijević, M.**, Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., & Dinčev, S., Anticandidal activity of *Satureja montana* and *Thymus vulgaris* essential oils: synergistic potential and anti-virulence efficacy. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina, Serbia, 2019.
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, & Janković, A., Antipseudomonal activity of *Satureja montana* L. essential oil and its synergistic potential with ciprofloxacin., 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina, Serbia, 2019.
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, & Stojković, O., Effects of *Satureja montana* L. essential oil against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates: anti-virulence and

synergistic potential. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara planina, Serbia, 2019.

- **Dimitrijević, M.**, Stojanović-Radić, Z., & Dimić, A., Synergistic and antimicrobial activities of *Origanum minutiflorum* L. and *Foeniculum vulgare* L. essential oils in mutual combination and with streptomycin, 14th Symposium with international participation "Novel Technologies and Economic Development", Faculty of Technology, Leskovac, Serbia, 2021.
- **Dimitrijević, M.**, Stojanović-Radić, Z., Stevanović, M., Nešić, M., & Radulović, N., Antimicrobial activity and chemical composition of *Helichrysum italicum* essential oil on isolates of the *Staphylococcus aureus* and isolates of the genus *Candida*: time-lapse kinetics and antibiofilm activity. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, Serbia, 2022.
- Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Aleksić, A., & Stanković, N., Antistaphylococcal activity of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils: time-lapse kinetics, antibiofilm activity and synergistic potential. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, Serbia, 2022.
- **Dimitrijević, M.**, Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Nešić, M., & Radulović, N., Antimicrobial and synergistic effects and chemical composition of the selected essential oils on clinical isolates of the genus *Candida*. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, Serbia, 2022.
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., & **Dimitrijević, M.**, Time lapse kinetics of sage and winter savory essential oils and combined oils effects against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, Serbia, 2022.
- Stojković, O., Živković Stošić, M., Radulović, N., **Dimitrijević, M.**, Otašević, S., & Stojanović-Radić, Z., Antifungal and anti-biofilm activity of *Thymus serpyllum* essential oil against *Aspergillus* otomycosis. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, Serbia, 2022.
- Stojković, O., Vasić, T., **Dimitrijević, M.**, & Stojanović-Radić, Z., Antimicrobial, anti-virulence and synergistic potential of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Klebsiella*

spp. and *Escherichia coli* clinical isolates. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, Serbia, 2022.

- Randelović M., Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević M.**, Ignjatović, A., Arsić-Arsenijević, V., & Otašević, S., Effects of antimycotics and *Melissa officinalis* L. essential oil on *Candida* spp. biofilms. 3rd Balkan Conference on Medical Mycology and Mycotoxicology Belgrade, Serbia October 10-12, 2024: 18.
- Randelović, M., Stojanović Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Ignjatović, A., Mladenović Antić, S., Đorđević, M., & Otašević, S., Comparison of MALDI TOF mass spectrometry and Integral system yeasts plus test in differentiation of yeasts species. Abstract book, 56th Days of Preventive Medicine - International Congress, Niš, Serbia, 2024: 141.

Саопштења са националних скупова штампана у изводу (M64):

- **Dimitrijević, M.**, Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Stanković, N., Joković, N., & Mihajilov-Krstev, T., Antimikrobna aktivnost i mehanizmi delovanja etarskog ulja omana (*Inula helenium*) na humane respiratorne izolate. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, 2018.
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Stanković, N., & Mihajilov-Krstev, T., Antimikrobna aktivnost i mehanizmi antimikrobnog delovanja etarskih ulja eukaliptusa i čajevca na humane respiratorne izolate. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, 2018.
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., & **Dimitrijević, M.**, Evaluation of antibiofilm activity of selected commercial essential oils. 13th Symposium with international participation “Novel Technologies and Economic Development” Faculty of Technology, Leskovac, Serbia, October, 18-19, 2019.
- Randelović, M., Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Ignjatović, A., Mijatović, S., Stojković, O., Arsić-Arsenijević, V., & Otašević, S., Komparativna analiza komercijalnih testova za diferenciranje kvasnica. Knjiga sažetaka, Simpozijum Dijagnoza i terapija gljivičnih oboljenja 9, Beograd, Srbija 2023: 7.
- Stojković, O., Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Randelović, M., & Otašević, S., Produkcija biofilma gljiva roda *Aspergillus* uzročnika otomikoza. Knjiga sažetaka, Simpozijum Dijagnoza i terapija gljivičnih oboljenja 9, Beograd, Srbija 2023: 9.

- Stojanović-Radić, Z., **Dimitrijević, M.**, Stojković, O., Randelović M., & Otašević, S., Antiglivična i antibiofilm aktivnost prirodnih produkata. Knjiga sažetaka, Simpozijum Dijagnoza i terapija gljivičnih oboljenja 9, Beograd, Srbija 2023: 18.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ЕФЕКАТ И СИНЕРГИСТИЧКО ДЕЈСТВО ЕТАРСКИХ УЉА ОДАБРАНИХ АРОМАТИЧНИХ И ЛЕКОВИТИХ БИЉНИХ ВРСТА НА РАСТ И ФАКТОРЕ ВИРУЛЕНЦИЈЕ ИЗОЛАТА РОДА *CANDIDA*

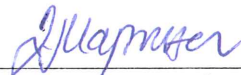
која је одбрањена на Природно-математичком факултету, Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 20.08.2025.

Потпис аутора дисертације:



Марина В. Димитријевић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

ЕФЕКАТ И СИНЕРГИСТИЧКО ДЕЈСТВО ЕТАРСКИХ УЉА ОДАБРАНИХ
АРОМАТИЧНИХ И ЛЕКОВИТИХ БИЉНИХ ВРСТА НА РАСТ И ФАКТОРЕ
ВИРУЛЕНЦИЈЕ ИЗОЛАТА РОДА *CANDIDA*

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 20.08.2025.

Потпис аутора дисертације:



Марина В. Димитријевић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ЕФЕКАТ И СИНЕРГИСТИЧКО ДЕЈСТВО ЕТАРСКИХ УЉА ОДАБРАНИХ АРОМАТИЧНИХ И ЛЕКОВИТИХ БИЉНИХ ВРСТА НА РАСТ И ФАКТОРЕ ВИРУЛЕНЦИЈЕ ИЗОЛАТА РОДА *CANDIDA*

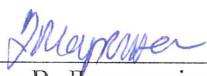
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)¹³

У Нишу, 20.08.2025.

Потпис аутора дисертације:


Марина В. Димитријевић

¹³ Аутор дисертације обавезан је да изабере и означи (заокружи) само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста.