

**ANTIBAKTERIJSKO DELOVANJE I CITOTOKSIČNI EFEKAT  
NATKRITIČNOG EKSTRAKTA TIMIJANA I EKSTRAKTA  
TIMIJANA DOBIJENOG PROCESOM HIDRODESTILACIJE\***  
*ANTIBACTERIAL EFFECT AND CYTOTOXIC EFFECT OF  
SUPERCRITICAL EXTRACTION OF THYME AND THYME EXTRACT  
OBTAINED THROUGH HYDRODISTILLATION PROCESS*

D. Mišić, J. Nišavić, Irena Žižović, Jasna Ivanović\*\*

Ispitivanjem antibakterijskog delovanja natkritičnog ekstrakta timijana (TNKE) i ekstrakta timijana dobijenog hidrodestilacijom (THD) je obuhvaćeno 18 sojeva bakterija iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus*, uključujući sojeve MRSA, sojeve VRE kao i referentne sojeve *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.agalactiae* ATCC 27959, *S.aureus* ATCC 11632 i *S.aureus* ATCC 25923. Antibakterijsko delovanje ekstrakata timijana ispitivano je primenom mikrodilucione metode u bujonu, a citotoksični efekat ekstrakata timijana ispitivan je na ćelijskoj liniji VERO. Dobijene vrednosti MIC THD ekstrakta kretale su se od 160 µg/mL do 1280 µg/mL za sve sojeve bakterija obuhvaćene ispitivanjem. Dobijene vrednosti MIC TNKE ekstrakta iznosile su 1280 µg/mL do >2560 µg/mL za sve ispitivane sojeve osim za 1 soj *S. intermedius* od 320 µg/mL. Citotoksični efekat na ćelijskoj liniji VERO ispitivani ekstrakti su ispolji u koncentracijama višim od 40 µg/mL.

*Ključne reči: ekstrakti, timijan, antibakterijsko delovanje, citotoksični efekat*

#### Uvod / Introduction

Iako se danas na tržištu lekova u svetu na raspolaganju nalazi preko 200 vrsta antibiotika i hemioterapeutika uključujući 50 vrsta penicilina, 70 vrsta cefalosporina i 20 vrsta hinolona, problem multirezistencije bakterija na antibiotike je

\* Rad primljen za štampu 24. 04. 2009. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Dušan Mišić, docent, dr sci. med. vet. Jakov Nišavić, asistent, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sci. Irena Žižović, docent, mr sci. Jasna Ivanović, istraživač saradnik, Katedra za organsku hemijsku tehnologiju, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

na vrhuncu aktuelnosti. Tokom 2001. godine samo u SAD je proizvedeno 24,6 miliona kilograma antibiotika za upotrebu u stočarskoj proizvodnji i veterini i približno 3 miliona kilograma za upotrebu kod ljudi (Aarestrup, 2005). Ovako obimna proizvodnja i potrošnja antibiotika dovela je do pogoršanja problema rezistencije bakterija i pojave sojeva patogenih bakterija koji su rezistentni na gotovo sve antibiotike. Takvi, multirezistentni sojevi svakodnevno se umnožavaju i naseljavaju farme, bolnice i druge ekološke niše i širom sveta dovode do teških infekcija kod životinja i ljudi, sa smrtnim ishodom. Sa druge strane, farmaceutska industrija u poslednjih 20 godina nije proizvela nijedan novi takozvani blockbuster antibiotik širokog spektra delovanja koji bi bio namenjen za široku upotrebu u humanoj i veterinarskoj medicini (Nordmann, 2007). Postoji nekoliko razloga za krizu u proizvodnji novih klasa antibiotika. Najpre, nisu otkrivene nove supstancije koje imaju visoku selektivnu toksičnost i stoga se, uprkos dobrom antibakterijskom delovanju, mnogi novi antibakterijski lekovi ne mogu upotrebiti u kliničkoj praksi jer deluju toksično na ćelije domaćina. Zatim, pretklinička i klinička ispitivanja novih antibiotika traju nekoliko godina, pa čak i decenija, veoma su skupa i neizvesna pa se postavlja pitanje isplativosti proizvodnje novih antibiotika. I na posletku, da bi se novi antibiotik plasirao na tržište potrebno je pokrenuti ogromnu višegodišnju marketinšku kampanju kako bi novi preparat došao do potrošača. Stoga su u poslednjih deset godina u svetu sve aktuelnija ispitivanja antibakterijskog delovanja neantibiotskih supstancija uključujući i biljne ekstrakte, a u cilju pronalazaženja novih sredstava u borbi protiv infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima bakterija.

Ekstrakcija aktivnih supstanci iz biljnog materijala uz primenu natkritičnih fluida (NKE) je metod razvijen poslednjih decenija dvadesetog veka koji ima brojne prednosti u odnosu na tzv. konvencionalne metode. Natkritična ekstrakcija se vrši fluidima koji se nalaze u ugušćenom stanju na temperaturi iznad svoje kritične temperature i pod pritiskom iznad svog kritičnog pritiska. U ovom stanju fluid se odlikuje velikom gustinom koja je bliska gustini tečnosti dok mu difuzivnost ostaje velika i bliska difuzivnosti gasova. Ovakve osobine omogućavaju da natkritični fluid lako prodire u biljni materijal i omogući ekstrakciju sekundarnih biljnih metabolita. Nakon ekstrakcije vrši se separacija fluida od ekstrakta tako što se snižava pritisak pri kome fluid prelazi u gasovito stanje. Na taj način se dobija ekstrakt potpuno slobodan od tragova rastvarača. Najčešće primenljiv rastvarač jeste ugljen-dioksid zbog povoljnih vrednosti temperature i pritiska kao njegovih kritičnih parametara (31,8°C, 7,38 MPa) ali i zato što je jeftin, lako dostupan i nije toksičan. Sa ugljen-dioksidom je moguće izvesti ekstrakciju na temperaturi oko 40°C, čime se izbegava degradacija termolabilnih aktivnih komponenti. Izborom pritiska (odnosno gustinom natkritičnog fluida) menja se ekstrakciona moć natkritičnog rastvarača. Niži pritisci pogoduju izolaciji komponenata manje molekulske mase, dok ekstrakcijom pri višim pritiscima u ekstraktu dominiraju komponente veće molekulske mase. Na taj način je biranjem uslova ekstrakcije (pritisak i temperatura) moguće dobiti ekstrakt sa maksimalnim sadržajem želje-

nih aktivnih supstanci. Jedini nedostatak primene NKE u industrijskim uslovima, u odnosu na konvencionalne metode, jesu veća investiciona ulaganja u opremu zbog rada na povišenim pritiscima. Međutim, sami troškovi proizvodnje su znatno manji, proces je jednostavniji i energetski isplativiji, a dobijeni proizvod je kvalitetniji i ima veću cenu na tržištu.

Stoga u poslednjih nekoliko godina u naučnoj i stručnoj javnosti vlada veliko interesovanje za mogućnost primene natkritičnih ekstrakata biljaka kao novih antimikrobnih sredstava ili kao aditiva hrani koji bi svojim prisustvom sprečili razmnožavanje prisutnih mikroorganizama, a time i kvar hrane (Burt, 2004). Osim toga, smatra se da natkritični ekstrakti nekih biljaka sprečavaju širenje gena rezistencije putem plazmida između bakterija (Schelz, 2006). Najveća prednost primene NKE dobijenih natkritičnom ekstrakcijom u odnosu na ekstrakte biljaka dobijene drugim tehnološkim procesima jeste upravo odsustvo primesa organskih rastvarača (alkohola, etra, hloroforma, acetona, itd) koji su toksični za domaćina i onemogućavaju širu primenu samih ekstrakata (Dorman i Deans, 2000). Sa druge strane, bez obzira na sve prednosti i kompleksniji sastav ekstrakata dobijenih natkritičnom ekstrakcijom kao i njihovu veliku tehničku čistoću, rezultati jednog broja istraživanja su pokazali da navedeni ekstrakti mogu imati slabije antibakterijsko delovanje u odnosu na ekstrakte dobijene drugim tehnološkim procesima.

S obzirom na to da je u prethodnim ispitivanjima antibakterijske aktivnosti natkritičnih ekstrakata nekih biljaka u našoj zemlji otkriveno solidno antibakterijsko delovanje tih ekstrakata na gram-pozitivne bakterije (Mišić i sar., 2008; Glišić i sar., 2007) i u ovo ispitivanje uključene su gram-pozitivne bakterije i to stafilokoke, streptokoke i enterokoke kao česti uzročnici lokalnih i sistemskih gnojnih infekcija ljudi i životinja koji lako stiču rezistenciju na antibiotike.

Danas najveću zabrinutost u humanoj i veterinarskoj medicini izazivaju takozvani MRSA sojevi stafilokoka (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*) i sojevi VRE (vankomicin-rezistentne *Enterococcus* vrste) koje su rezistentne na većinu postojećih antibiotika i dovode do izrazito teških i često smrtonosnih infekcija kod ljudi (Duquette, 2004; Vengust, 2006). Prisustvo MRSA i VRE sojeva predstavlja gotovo nerešiv problem u humanoj medicini ali i ozbiljnu pretnju u veterinarskoj medicini zbog mogućnosti nastajanja i prenošenja sojeva MRSA i VRE sa životinja na ljude. Sojevi MRSA prevashodno nastaju u bolnicama s obzirom na to da su bolnice specifične ekološke niše u kojima su bakterije konstantno izložene delovanju velikog broja antibiotika. Početkom 2000. godine došlo je do proširivanja sojeva MRSA iz bolnica na civilno stanovništvo zahvaljujući takozvanim asimptomatskim nosiocima sojeva MRSA. Za razliku od toga, sojevi VRE nastajali su prevashodno kod životinja na farmama, jer su farme, slično bolnicama, takođe ekološke niše u kojima se bakterije intenzivno izlažu delovanju antibiotika. Tačnije, u istraživanjima 1997. godine na jednoj farmi živine u Danskoj, prvi put je otkrivena direktna veza između avoparcina – glikopeptidnog antibiotika korišćenog kao promotera rasta i pojave vankomicin rezistentih sojeva *Enterococcus*

vrsta (VRE) (Aarstrup, 2000). U tom istraživanju, ne samo što je otkriven ovaj oblik ukrštene rezistencije nego je ustanovljeno i da se bez prethodnog širenja gena rezistencije, sojevi VRE poreklom iz creva svinja i živine tretiranih avoparcinom direktno prenose na ljude, pse, mačke, miševe, čak i insekte i tako raznose na velike udaljenosti da bi u direktnom kontaktu sa prijemčivim ljudima izazivali ozbiljne infekcije. Interesantno je da sojevi VRE kod životinja kod kojih su nastali, kao i uopšte u veterinarskoj medicini, za sada, ne dovode do zdravstvenih problema. Ovi sojevi predstavljaju zdravstvenu opasnost samo u humanoj medicini, ali su životinje, kako je već rečeno, potencijalno opasni izvor ovih sojeva bakterija za populaciju ljudi.

## **Materijal i metode rada / *Materials and methods***

### *Materijal*

Za ispitivanje antibakterijskog i citotoksičnog delovanja korišćeni su ekstrakti timijana sa područja južnog Balkana (berba 2006.) dobijeni procesom natkritične ekstrakcije (TNKE) i hidrodestilacije (THD).

Ispitivanjem je obuhvaćeno 18 sojeva bakterija iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus*, uključujući sojeve MRSA, sojeve VRE i referentne sojeve *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.agalactiae* ATCC 27959, *S.aureus* ATCC 11632 i *S.aureus* ATCC 25923. Svi ispitivani sojevi bakterija izolovani su iz uzoraka briseva kože, očiju i ušiju poreklom od pasa, mačaka i ljudi obolelih od infekcije kože i konjunktivitisa, osim jednog soja VRE koji je izolovan iz uzorka mozga uginulog psa i jednog soja *E.faecalis* koji je izolovan iz uzorka jetre uginulog laboratorijskog miša. Uzorci briseva dostavljani su na rutinsku mikrobiološku analizu u laboratoriju za bakteriologiju i mikologiju Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu tokom 2007. i 2008. godine.

Za izolaciju i identifikaciju bakterija korišćeni su krvni agar sa 6% ovčije krvi (bioMerieux), Columbia agar sa kolistinom i nalidiksičnom kiselinom (Becton Dickinson) i hranljivi bujon (BioLab). Za tipizaciju sojeva bakterija do vrste upotrebljen je BBL Crystal gram positive id kit (Becton Dickinson). U cilju otkrivanja sojeva MRSA korišćeni su antibiogram diskovi oksacilina koncentracije 1 µg i cefoksitina koncentracije 30 µg, a ispitivanje je vršeno na Mueller Hinton agaru (bioMerieux). Slično tome, u cilju otkrivanja sojeva VRE korišćeni su antibiogram diskovi vankomicina koncentracije 30 µg (Becton Dickinson), takođe na Mueller Hinton agaru.

Antibakterijsko delovanje ekstrakata timijana ispitivano je u mikrotitracionim pločama sa "U" dnom (Spektar) uz upotrebu Mueller Hinton bujona sa korigovanom količinom jona kalcijuma i magnezijuma (Becton Dickinson) uz datak indikatora 1,6% brom krezol ljubičastog (Merck) u finalnoj količini od 100 µL/100 mL podloge. Pre upotrebe ekstrakti TNKE i THD rastvarani su direktno u DMSO (dimetilsulfoksid, Sigma). Suspenzija bakterija za inokulaciju pripremana

je u sterilnom 0,85% rastvoru NaCl (Zorka), a finalna gustina inokuluma iznosila je približno  $5 \times 10^5$  CFU/mL.

Citotoksični efekat ekstrakata timijana (TNKE i THD) timijana u koncentracijama od 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20 i 10  $\mu\text{g/mL}$  ispitivan je na ćelijskoj liniji VERO (ćelije bubrega velikog zelenog afričkog majmuna) u mikrotitracionim pločama sa ravnim dnom (Spektar). Za ispitivanje citotoksičnog delovanja ekstrakta timijana su rastvarani u DMSO čija je koncentracija iznosila 16  $\mu\text{g/mL}$ . Ćelijska linija VERO je održavana standardnom metodom tripsinizacije i subpasažama. Kao hranljiva podloga za njihov rast korišćena je Eagle - MEM (Sigma) sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (Sigma) kao i 100 IU/ml penicilina (Sigma), 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomocina (Sigma) i 25 IU/ml nistatina (Sigma) radi sprečavanja kontaminacije ćelijskih linija bakterijama i gljivicama. Radi dobijanja subpasaža, ćelijske linije su tripsinizirane kombinacijom tripsin-versena (Becton Dickinson). Suspenzija tripsiniziranih ćelija je razlivena u mikrotitracione ploče sa ravnim dnom i inkubisana na temperaturi od  $36^\circ\text{C}$  u atmosferi sa 5-10% $\text{CO}_2$ . Nakon dobijanja kontinuiranog rasta ćelija na dnu mikrotitracione ploče, vršena su dalja ispitivanja CTE ekstrakata.

#### *Metode*

Natkritična ekstrakcija timijana izvedena je na temperaturi od  $40^\circ\text{C}$  i pritisku od 11,5 Mpa u prethodno opisanom (Zizovic i sar., 2007) laboratorijskom postrojenju za NKE Autoclave Engineers SCE Screening System, sa ugljen-dioksidom kao natkritičnim fluidom. Hidrodestilacija timijana izvedena je u laboratorijskoj aparaturi za hidrodestilaciju po Klevendžeru u trajanju od 4 sata.

Izolacija i identifikacija bakterija vršena je primenom konvencionalnih mikrobioloških metoda. Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva *Staphylococcus* vrsta na oksacilin u cilju otkrivanja sojeva MRSA, kao i *Enterococcus* vrsta na van-komicin u cilju otkrivanja sojeva VRE, vršeno je primenom disk difuzione metode prema preporukama CLSI iz 2008. godine (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA). Antibakterijsko delovanje ekstrakata timijana ispitivano je primenom mikrodilucione metode u bujonu, takođe na osnovu CLSI standarda iz 2008. godine.

Citotoksični efekat ekstrakata timijana u različitim koncentracijama praćen je pomoću invertnog mikroskopa (Karl Zeiss) u različitim vremenskim intervalima (2h, 4h i 24 h).

#### **Rezultati / Results**

Rezultati ispitivanja antibakterijskog delovanja ekstrakata timijana prikazani su u tabeli 1. Može se uočiti da je ekstrakt timijana dobijen procesom hidrodestilacije (THD) imao značajno jače antibakterijsko delovanje od natkritičnog ekstrakta timijana (TNKE).

Dobijene vrednosti MIC THD ekstrakta kretale su se od 160 µg/mL do 1280 µg/mL za sve sojeve bakterija obuhvaćene ispitivanjem. Najjače antibakterijsko delovanje sa vrednosti MIC od 160 µg/mL ispoljio je ekstrakt THD na 4 soja *Staphylococcus* vrsta i to *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, dva soja *Staphylococcus intermedius* poreklom od psa i mačke i 1 soj *Staphylococcus epidermidis* poreklom od mačke. Ekstrakt THD je ispoljio i dobro antibakterijsko delovanje sa vrednošću MIC od 320 µg/mL za sve stafilokoke iz kategorije MRSA obuhvaćene ovim ispitivanjem i to na 1 soj *S.capitis* poreklom od psa, na 2 soja *S.haemolyticus* poreklom od psa i mačke i na 1 soj *S.epidermidis* takođe porekom od mačke. Ekstrakt timijana THD ispoljio je umereno jako antibakterijsko delovanje na sojeve *Enterococcus* vrsta (uključujući i sojeve VRE) sa vrednostima MIC od 640 µg/mL. Identičnu vrednost MIC ekstrakt THD ispoljio je i na dva soja *Staphylococcus* vrsta i to *S.aureus* ATCC 25923 i *S.epidermidis* poreklom sa kože psa. Ekstrakt nije delovao na *Streptococcus* vrste uključene u ovo ispitivanje, odnosno vrednosti MIC ekstrakata su iznosile >2560 µg/mL za ove sojeve bakterija.

Tabela 1. Rezultati antibakterijskog delovanja ekstrakta timijana dobijenih procesom hidrodestilacije (THD) i natkritične ekstrakcije (NKE)

Table 1. Results of antibacterial effect of thyme extract obtained by hydrodistillation process (THD) and supercritical extraction (NKE)

Ispitivani soj i njegovo poreklo / <i>Examined strain and its origin</i>	Vrednosti MIC u mg/mL / <i>MIC VALUE in µg/mL</i>	
	Timijan HD / <i>Thyme HD</i>	Timijan NKE / <i>Thyme NKE</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	1280	2560
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 27959	1280	2560
<i>Streptococcus uberis</i> – koža zamorca / <i>guinea pig skin</i>	1280	2560
<i>S. equi</i> ssp. <i>Zooepidermicus</i> – koža psa / <i>dog skin</i>	1280	2560
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) – prepucijum psa / <i>dog prepuce</i>	640	2560
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) – mozak psa / <i>dog brain</i>	640	2560
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) – humani urin / <i>human urine</i>	640	1280
<i>Enterococcus faecalis</i> – jetra miša / <i>mouse liver</i>	640	2560
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	160	>2560
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	640	>2560
<i>Staphylococcus intermedius</i> – uho psa / <i>dog ear</i>	160	1280
<i>Staphylococcus capitis</i> (MRSA) – uho psa / <i>dog ear</i>	320	>2560
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (MRSA) – oko psa / <i>dog eye</i>	320	2560
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (MRSA) – nos psa / <i>dog nose</i>	320	2560
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSA) – koža mačke / <i>cat skin</i>	320	2560
<i>Staphylococcus epidermidis</i> – oko mačke / <i>cat eye</i>	160	1280
<i>Staphylococcus intermedius</i> – oko psa / <i>dog eye</i>	160	320
<i>Staphylococcus epidermidis</i> – koža psa / <i>dog skin</i>	640	1280

Natkritični ekstrakt timijana (TNKE) pokazao je dobro antibakterijsko delovanje samo na 1 soj od svih sojeva uključenih u ispitivanje i to na soj *S.intermedius* izolovan iz oka psa sa dobijenom vrednošću MIC od 320 µg/mL. Natkritični ekstrakt timijana (TNKE) nije pokazao antibakterijsko delovanje u primenjenim koncentracijama za ostale sojeve bakterija obuhvaćene ispitivanjem, jer su dobijene vrednosti MIC ovog ekstrakta iznosile 1280 µg/mL do >2560 µg/mL za sve ostale ispitivane sojeve.

Rezultati citotoksičnog delovanja ekstrakata timijana prikazani su u tabelama 2 i 3 kao i na slikama 1, 2 i 3. Najpre je ispitivan citotoksični efekat rastvarača za ekstrakte dimetilsulfoksida (DMSO) u koncentracijama od 1 µg/mL do 2560 µg/mL. Ispitivanjem je dobijena granična koncentracija DMSO od 16 µg/mL koja nije ispoljila citotoksično delovanje na ćelije VERO. Pre ispitivanja citotoksičnosti, ekstrakti timijana su rastvarani u podlozi za kulturu ćelija Eagle MEM uz dodatak 16 µg/mL DMSO. Interesantno je da je DMSO u koncentracijama većim od 16 µg/mL pokazao citotoksični efekat već posle 2 časa inkubacije na 37°C, dok u koncentracijama od 16 µg/mL i nižim nije ispoljio citotoksični efekat ni posle 48 časova inkubacije.

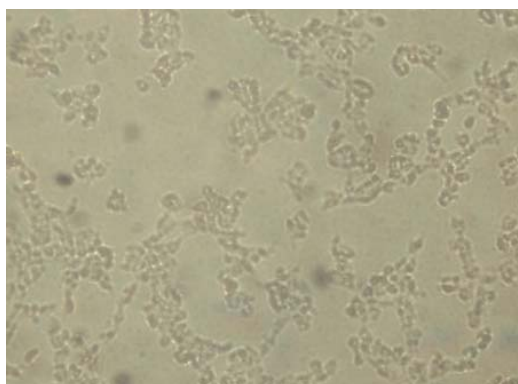
Praćenje pojave citotoksičnog efekta ekstrakata timijana na VERO ćelijama vršeno je mikroskopski posle 2, 4 i 24 časa. U prvih 4 časa inkubacije nisu se pojavile promene na VERO ćelijama, a nakon 24 časa inkubacije ustanovljen je jak citotoksični efekat oba ispitivana ekstrakta (THD i TNKE) u koncentracijama od 80 µg/mL do 2560 µg/mL. Ispitivani ekstrakti u koncentracijama od 40 µg/mL i nižim nisu ispoljili citotoksično delovanje, odnosno ćelije VERO ostale su nepromenjene i identičnog izgleda kao i kontrole.

Tabela 2. Praćenje citotoksičnog efekta ekstrakta timijana THD na ćelije VERO /  
Table 2. Following cytotoxic effect of thyme extract THD on VERO cells

Vreme očitavanja / Time of reading	Ispitivane koncentracije u µg/mL / Examined concentrations in µg/mL								
	2560	1280	640	320	160	80	40	20	10
2 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h	+	+	+	+	+	+	-	-	-

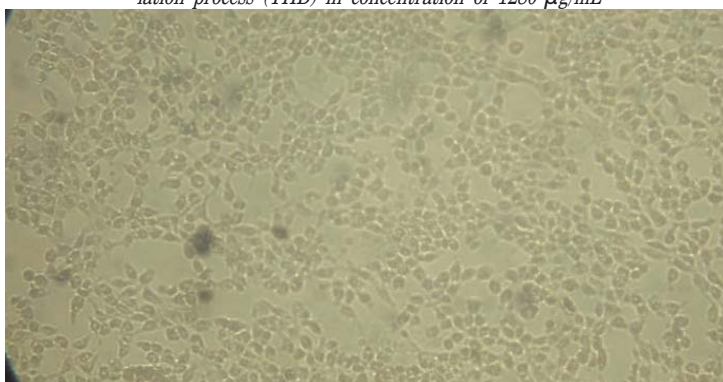
Tabela 3. Praćenje citotoksičnog efekta ekstrakta timijana TNKE na ćelije VERO /  
Table 3. Following cytotoxic effect of thyme extract TNKE on VERO cells.

Vreme očitavanja / Time of reading	Ispitivane koncentracije u µg/mL / Examined concentrations in µg/mL								
	2560	1280	640	320	160	80	40	20	10
2 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h	+	+	+	+	+	+	-	-	-



Slika 1. Izgled ćelija VERO (citotoksični efekat) u prisustvu ekstrakta timijana dobijenog procesom hidrodestilacije (THD) u koncentraciji od 1280 µg/mL /

Figure 1. Appearance of VERO cells (cytotoxic effect) in presence of thyme extract obtained by hydrodistillation process (THD) in concentration of 1280 µg/mL



Slika 2. Izgled ćelija VERO (citotoksični efekat) u prisustvu ekstrakta timijana dobijenog procesom natkritične ekstrakcije (TNKE) u koncentraciji od 1280 µg/mL /

Figure 2. Appearance of VERO cells (cytotoxic effect) in presence of thyme extract obtained by supercritical extraction process (TNKE) in concentration of 1280 µg/mL



Slika 3. Izgled ćelija VERO u kontrolama bez prisustva ekstrakata timijana /

Figure 3. Appearance of VERO cells in controls without presence of thyme extract



## **Diskusija / Discussion**

U ovom ispitivanju korišćena je mikrodiluciona metoda u bujonu za određivanje vrednosti MIC antibiotika prema preskripciji CLSI, 2008. Jedina modifikacija metode odnosila se na to da su umesto antibiotika korišćeni biljni ekstrakti, ali procedura, princip metode kao i način pripremanja i vrste hranljivih podloga nisu promenjeni.

Koekstrakcija smola i masnih ulja je jedna od otežavajućih okolnosti u ispitivanjima antimikrobnog delovanja natkritičnih ekstrakata jer se oni ne rastvaraju u vodi, a metode za određivanje vrednosti MIC baziraju se na rastvaranju supstancija čija se vrednost MIC ispituje u vodenim (tečnim) rastvorima odnosno hranljivim podlogama. Pojedini autori preporučuju zagrevanje hranljive podloge i samih ekstrakata radi lakšeg rastvaranja, ali ta metoda rada nije primenjena s obzirom na to da su mnogi sastojci ekstrakata termolabilni pa se raspadaju ili deaktiviraju na višim temperaturama. Stoga je kao rastvarač bio korišćen DMSO koji nema antibakterijsko delovanje. Za potrebe ispitivanja antibakterijskog delovanja ekstrakata timijana (THD i TNKE) korišćen je nerazblaženi DMSO.

Nije isključeno da su DMSO i ekstrakti timijana imali sinergističko citotoksično delovanje na ćelije VERO, tj postoji mogućnost da bi čisti, nerastvoreni ekstrakti imali slabiji citotoksični efekat bez prisustva DMSO, međutim, za sada se ova pretpostavka ne može proveriti jer ekstrakte timijana, kako THD tako i TNKE nije moguće razblaživati do ispitivanih koncentracija ukoliko se prethodno ne rastvori u DMSO.

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da su ekstrakti timijana imali citotoksični efekat na ćelijama VERO u koncentracijama od 80 µg/mL i više dok je u antibakterijskim ispitivanjima najmanja dobijena vrednost MIC ovih ekstrakata iznosila 160 µg/mL. Drugačije rečeno, ekstrakti timijana u koncentracijama 160 µg/mL i višim ne mogu biti primenjeni u kliničkoj terapiji infekcija izazvanih stafilokokama, streptokokama i enterokokama iako su pokazali dobro antibakterijsko delovanje naročito na stafilokoke, upravo iz razloga što ovi ekstrakti imaju citotoksični efekat u svim koncentracijama koje odgovaraju dobijenim vrednostima MIC.

Značajno je da se istakne da kao rastvarač za biljne ekstrakte (uljane supstancije) može da se koristi i 1,2-propanediol (propilen glikol). Ova supstanca takođe pokazuje citotoksično delovanje na ćelije VERO u određenim, manjim koncentracijama, ali se uprkos tome u farmaceutskoj industriji koristi za rastvaranje uljanih lekovitih supstancija za primenu u veterinarskoj i humanoj medicini. Međutim, u preliminarnim ispitivanjima je ustanovljeno da se ekstrakti timijana THD i TNKE značajno bolje rastvaraju u DMSO nego u 1,2-propanediolu pa je stoga u ovom ispitivanju korišćen samo DMSO.

### Zaključak / Conclusion

Ekstrakt timijana dobijen procesom hidrodestilacije (THD) ima jako do umereno jako antibakterijsko delovanje na neke sojeve *Stahylococcus* i *Enterococcus* vrsta uključujući i sojeve MRSA i VRE. Ekstrakt timijana dobijen procesom natkritične ekstrakcije (TNKE) nije pokazao dobro antibakterijsko delovanje na većinu ispitivanih sojeva bakterija osim na 1 soj *Stahylococcus intermedius*. Ispitivani ekstrakti timijana nisu pokazali antibakterijsko delovanje na *Streptococcus* vrste uključene u ovo ispitivanje. Ispitivani ekstrakti timijana pokazali su jak citotoksični efekat na ćelije VERO u relativno niskoj koncentraciji od 80 µg/mL.

### Literatura / References

1. Burt S. Essential oils – their antimicrobial properties and potential application in foods – a review, *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-53.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, 2008.
3. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 308-16.
4. Glišić S, Mišić D, Stamenić M, Zizovic I, Ašanin R, Skala D. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carrot Fruit Essential Oil – Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Food Chemistry* 2007; 105: 346-52.
5. Mišić D, Žižović I, Stamenić M, Ašanin R, Ristić M, Petrović SD, Skala D. Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling. *Biochemical Engineering Journal* 2008; 42, 148-52.
6. Aarestrup FM. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS* 2000; 101: 1-48.
7. Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L. Superbugs in the coming new decade: multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Current Opinion in Microbiology* 2007; 10: 1-5.
8. Vengust M, Anderson MEC, Rousseau J, Weese JS. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Letters in Applied Microbiology* 2006; 43: 602-6.
9. Žižović I, Stamenić M, Orlović A, Skala D. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale. *Journal of Supercritical Fluids* 2007; 39: 338-46.

ENGLISH

**ANTIBACTERIAL EFFECT AND CYTOTOXIC EFFECT OF SUPERCRITICAL EXTRACTION OF THYME AND THYME EXTRACT OBTAINED THROUGH HYDRODISTILLATION PROCESS**

**D. Mišić, J. Nišavić, Irena Žižović, Jasna Ivanović**

Investigations of antibacterial effect of supercritical extraction of thyme (TNKE) and thyme extract obtained by hydrodistillation (THD) covered 18 bacteria strains from the genera *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus*, including the strains MRSA, the strains VRE, as well as the reference strains *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. agalactiae* ATCC 27959, *S. aureus* ATCC 11632, and *S. aureus* ATCC 25923. The antibacterial effect of thyme extracts was examined using the microdilution method in bouillon, and the cytotoxic effect of thyme extract was examined on the VERO cell line. The obtained values for MIC THD extract ranged from 160 µg/mL to 1280 µg/mL for all bacteria strains covered by the investigations. The obtained values for MIC TNKE extract were 1280 µg/mL to 2560 µg/mL for all examined strains except for 1 strain of *S. intermedius* of 320 µg/mL. The examined extracts revealed a cytotoxic effect on the VERO cell line in concentrations higher than 40 µg/mL.

Key words: extracts, thyme, antibacterial effect, cytotoxic effect

РУССКИЙ

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НАДКРИТИЧЕСКОГО ЭКСТРАКТА ТИМЬЯНА И ЭКСТРАКТА ТИМЬЯНА, ПОЛУЧЕННОГО ПРОЦЕССОМ ГИДРОДИСТИЛЛЯЦИИ**

**Д. Мишич, Й. Нишавич, Ирена Жижович, Ясна Иванович**

Испытанием антибактериального действия надкритического экстракта (ТНКЕ) и экстракта тимьяна, полученного гидроdistилляцией (ТГД) охвачено 18 штаммов бактерий из родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*, включая штаммы MRSA, штаммы ВРЕ словно и референтные штаммы *S. pyogenes* АТЦЦ 19615, *S. agalactiae* АТЦЦ 27959, *S. aureus* АТЦЦ 11632 и *S. aureus* АТЦЦ 25923. Антибактериальное действие экстрактов тимьяна испытывано применением микродилуционного метода в бульоне, а цитотоксический эффект экстрактов тимьяна испытыван на клеточной линии ВЕРО. Полученные стоимости МИК ТГД экстракта двигались от 160 µг/мл до 1280 µг/мл для всех штаммов бактерий, охваченные испытанием. Полученные стоимости МИК ТНКЕ экстракта составляли (в сумме) 1280 µг/мл до >2560 µг/мл для всех испытанных штаммов кроме за 1 штамм *S. intermedius* от 320 µг/мл. Цитотоксический эффект на клеточной линии ВЕРО испытываны экстракты проявили в концентрациях высшим от 40 µг/мл.

Ключевые слова: экстракты, тимьян, антибактериальное действие, цитотоксический эффект