



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

**Bioaktyvumo ir fitocheminės analizės įvertinimas bei
palyginimas vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir
pipirmėtės (lot. *Mentha piperita* L.) augalų ekstraktuose**

Baigiamasis magistro projektas

Vestina Ramonaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

**Bioaktyvumo ir fitocheminės analizės įvertinimas bei
palyginimas vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir
pipirmėtės (lot. *Mentha piperita* L.) augalų ekstraktuose**

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Vestina Ramonaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Odeta Baniukaitienė

Recenzentė

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas

Farmacijos fakultetas

Vestina Ramonaitė

Bioaktyvumo ir fitocheminės analizės įvertinimas bei palyginimas vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir pipirmėtės (lot. *Mentha piperita* L.) augalų ekstraktuose

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – KTU) ir Lietuvos sveikatos universiteto (toliau – LSMU) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei KTU ir LSMU akademinės etikos kodeksuose nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal KTU ar LSMU galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta iš KTU ar LSMU, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Vestina Ramonaitė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Ramonaitė, Vestina. Bioaktyvumo ir fitocheminės analizės įvertinimas bei palyginimas vaistinio šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir pipirmėtės (lot. *Mentha piperita* L.) augalų ekstraktuose. Baigiamasis magistro projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų kryptių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: šalavijas, pipirmėtė, bioaktyvumas, fitocheminė analizė.

Kaunas, 2022. 71 p.

Santrauka

Fitocheminės medžiagos ne tik apsaugo augalus nuo biotinio ar abiotino streso, bet ir naudojamos farmacijos, maisto, žemės ūkio pramonėje. Dauguma rinkoje siūlomų vaistinių preparatų yra sintetinės natūralių medžiagų modifikacijos. Pastaruoju metu išaugus vartotojų susidomėjimui natūraliais produktais yra siekiama pagerinti bioaktyvių junginių gamybą augaluose, todėl plačiau tiriamos įvairios strategijos, ieškoma platesnio ir efektyvesnio šių medžiagų panaudojimo būdų.

Vaistiniame šalavijuje (lot. *Salvia officinalis* L.) ir pipirmėtuje (lot. *Mentha piperita* L.) sintetinamas platus spektras fitocheminių medžiagų, lemiančių jų bioaktyvumą. Šiame darbe buvo kiekybiškai įvertinti pipirmėtės (lot. *Mentha piperita* L.) ir šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) antriniai metabolitai bei vaistinių augalų ekstraktų bioaktyvumas. *In vitro* ir *in vivo* ekstraktuose iširta šių augalų bendroji fenolinių junginių, flavonoidų, fenolinių rūgščių, baltymų, aminorūgščių, karotinoidų, askorbo rūgšties, antocianinų koncentracija bei antibakterinis aktyvumas prieš *Xanthomonas campestris* ir *Rhizobium radiobacter* bakterijas. Taip pat nustatytas antioksidacinis aktyvumas pagal ABTS, DPPH, FRAP ir redukcinį metodą bei antioksidacinių fermentų aktyvumas.

Didžiausiu antioksidaciniu potencialu iš *S. officinalis* bandinių pasižymėjo šalavijo lapų kaliaus kultūrų *in vitro*, augintų ant MS terpės su NAR (0,1 mg/l), BAP (0,2 mg/l) ir 2,4-D (0,5 mg/l), ekstraktai, o iš *M. piperita* - pipirmėtės lapų ir stiebų kaliaus kultūrų *in vitro*, augintų ant MS terpės su BAP (1 mg/l), ekstraktas. Gauta, kad šalavijo kaliaus kultūrose iš lapų *in vitro*, augintų MS terpėje, papildytoje NAR (0,1 mg/l), BAP (0,2 mg/l) ir 2,4-D (0,5 mg/l) fitoformonais, ekstrakto rastos didžiausios koncentracijos chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų, askorbo rūgšties, aminorūgščių, antioksidacinių fermentų, fenolinių junginių, flavonoidų, be to, rezultatai koreliuoja su iširtu antioksidaciniu pajėgumu. Didžiausios fenolinių rūgščių ir baltymų koncentracijos nustatytos pipirmėtės stiebų kaliaus kultūroms, augintoms MS terpėje su BAP (1 mg/l), 2,4-D (0,2 mg/l), ekstrakto, o *M. piperita* lapų *in vivo* ekstrakto rasta didžiausia antocianinų koncentracija. Iš tiriamųjų augalų, efektyviausiu antibakteriniu aktyvumu prieš *Xanthomonas campestris* ir *Rhizobium radiobacter* pasižymėjo šalavijo lapų kaliaus ekstraktas, kurio slopinimo zona siekė 7,67 mm.

Gauti rezultatai leidžia manyti, kad *Salvia officinalis* L. ir *Mentha piperita* L. augalai gali būti naudojami didelės apimties vaistinių metabolitų gamybai ir būti antimikrobiniais ar antioksidaciniais agentais, tačiau tam reikalingi tolesni tyrimai.

Ramonaitė, Vestina. Evaluation and Comparison of Bioactivity and Phytochemical Analysis in Sage (*Salvia Officinalis* L.) and Peppermint (*Mentha Piperita* L.) Plants Extracts. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: sage, peppermint, bioactivity, phytochemical analysis.

Kaunas, 2021. 71 pages.

Summary

Phytochemicals not only protect plants from biotic or abiotic stress, but are also used in the pharmaceutical, food and agricultural industries. Most of the medicines on the market are synthetic modifications of natural substances. At present, the growing interest of consumers in natural products is aimed at improving the production of bioactive compounds in plants, so various strategies are being researched more widely, and more efficient way of using these substances is being sought. Medicinal sage (*Salvia officinalis* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.) synthesize a wide range of phytochemical substances that determine their bioactivity. In this work, the secondary metabolites of peppermint (*Mentha piperita* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) and the bioactivity of medicinal plant extracts were quantified. The total concentrations of phenolic compounds, flavonoids, phenolic acids, proteins, amino acids, carotenoids, ascorbic acid, anthocyanins and antibacterial activity against *Xanthomonas campestris* and *Rhizobium radiobacter* were tested *in vitro* and *in vivo* extracts. Antioxidant activity according to ABTS, DPPH, FRAP and reduction method as well as activity of antioxidant enzymes were also determined. The highest antioxidant potential of *S. officinalis* samples was in sage leaves *in vitro* cultures grown on MS medium with NAA (0.1 mg/l), BAP (0.2 mg/l) and 2,4-D (0.5 mg/l) and the best extract of *M. piperita* was peppermint leaves and stems *in vitro* grown on MS medium with BAP (1 mg/l). The highest concentrations of chlorophyll *a* and *b*, carotenoids, ascorbic acid, amino acids, antioxidant enzymes, phenolic compounds, flavonoids were found in the sage leaves callus culture extracts grown on MS media supplemented with NAA (0.1 mg/l), BAP (0.2 mg/l) and 2,4-D (0.5 mg/l), in addition, the results correlate with the investigated antioxidant capacity. The highest concentrations of phenolic acids and proteins were found in peppermint stem callus cultures grown on MS medium with BAP (1 mg/l), 2,4-D (0.2 mg/l) extract, and the highest concentration of anthocyanin was found in *M. piperita* leaf *in vivo* extract. Of the tested plants, the most effective antibacterial activity against *Xanthomonas campestris* and *Rhizobium radiobacter* was the sage leaf extract with a zone of inhibition –7.67 mm. The results obtained suggest that plants of *Salvia officinalis* L. and *Mentha piperita* L. may be used for the production of large-scale medicinal metabolites and may be antimicrobial or antioxidant agents, but this requires further investigation.

Turinys

Santrumpų sąrašas	9
Įvadas	10
1. Literatūros apžvalga	11
1.1. Vaistinio šalavijo charakteristika	11
1.2. Augalų kaliaus <i>in vitro</i> ir suspensinės kultūros augalų biotechnologijoje	12
1.3. Biologiškai aktyvūs junginiai, fitochemikalai augaluose	15
1.3.1. Pirminiai metabolitai	15
1.3.2. Karotinoidai ir chlorofilas	16
1.3.3. Askorbo rūgštis	16
1.3.4. Peptidai (aminorūgštys)	17
1.3.5. Antriniai metabolitai	17
1.3.6. Fenoliniai junginiai	17
1.3.7. Terpenai	18
1.3.8. Glikozidai	18
1.3.9. Eteriniai aliejai	19
1.4. <i>Salvia officinalis</i> ir <i>Mentha piperita</i> antioksidacinė veikla	19
1.5. Antimikrobinis <i>M. piperita</i> ir <i>S. officinalis</i> poveikis	21
1.6. Vaistinio šalavijo panaudojimas medicinoje	22
1.7. Vaistinės pipirmėtės panaudojimas medicinoje	23
1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	24
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	25
2.1. Reagentai	25
2.2. Darbo priemonės ir aparatūra	25
2.3. <i>S. officinalis</i> ir <i>M. piperita</i> sėklų sterilinimas	25
2.4. Vaistinių augalų ląstelių mitybinės terpės paruošimas	26
2.5. Augimo hormonų paruošimas	27
2.6. Augalinių žaliavų paruošimas tyrimams	28
2.7. Antioksidaciniai tyrimai	28
2.7.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu	28
2.7.2. <i>S. officinalis</i> ir <i>M. piperita</i> antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil- <i>s</i> -triaziną (TPTZ)	28
2.7.3. Šalavijo ir pipirmėtės redukcinių savybių nustatymas	29
2.7.4. Pipirmėtės ir šalavijo antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu	29
2.8. Augalų bioaktyvių metabolitų nustatymas	29
2.8.1. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu	29
2.8.2. Flavonoidų koncentracijos nustatymas pipirmėtėje ir šalavijuje	30
2.8.3. Fenolinių rūgščių nustatymas pipirmėtėje ir šalavijuje	30
2.8.4. Pipirmėtės ir šalavijo pigmentų koncentracijos nustatymas	30
2.8.5. Liuteino koncentracija <i>S. officinalis</i> ir <i>M. piperita</i> augaluose	31
2.8.6. Šalavijo ir pipirmėtės bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas	31
2.8.7. Askorbo rūgšties kiekybinis nustatymas	32
2.8.8. Baltymų koncentracijos nustatymas <i>S. officinalis</i> ir <i>M. piperita</i> augaluose	32
2.8.9. <i>L</i> -Prolino nustatymas vaistiniuose augaluose	32
2.8.10. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas	33

2.9. Antioksidaciniai fermentai	33
2.9.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas augaluose.....	33
2.9.2. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas <i>S. officinalis</i> ir <i>M. piperita</i> augaluose	34
2.10. Antibakterinis aktyvumas	35
2.10.1. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinis įvertinimas prieš <i>Xanthomonas campestris</i> ; <i>Rhizobium radiobacter</i> bakterijas.....	35
2.11. Statistinė analizė	35
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	36
3.1. Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumo įvertinimas.....	36
3.1.1. Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu	36
3.1.2. Vaistinio šalavijo ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu su skiedimu.....	37
3.1.3. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-triptidil-s- triaziną	38
3.1.4. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-triptidil-s- triaziną su skiedimu	40
3.1.5. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose	41
3.1.6. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose su skiedimu.....	42
3.1.7. Vaistinis augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu	43
3.2. Bioaktyvių metabolitų tyrimai.....	43
3.2.1. Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino-Kiokalto metodu	43
3.2.2. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas.....	45
3.2.3. Bendras fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje.....	46
3.2.4. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų nustatymas vaistiniuose augaluose.....	46
3.2.5. Liuteino koncentracijos įvertinimas augaluose	48
3.2.6. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas pipirmėtėje ir šalavijuje	48
3.2.7. Askorbo rūgšties kiekybinis įvertinimas augaluose	49
3.2.8. Baltymų koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje.	50
3.2.9. <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas.....	51
3.2.10. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas	52
3.3. Antioksidacinių fermentų nustatymas	53
3.3.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas.....	53
3.3.2. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas	54
3.4. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas.....	54
3.4.1. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinį įvertinimas prieš <i>Xanthomonas campestris</i> ; <i>Rhizobium radiobacter</i> bakterijas.....	54
Rekomendacijos	57
Išvados	58
Literatūros sąrašas	59
Priedai.....	72
1 priedas. Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu.....	72
2 priedas. Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu su skiedimais	72
3 priedas. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-triptidil- s-triaziną.	73
4 priedas. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-triptidil- s-triaziną su skiedimais.....	74
5 priedas. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose.....	74

6	priedas. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose su skiedimais.....	75
7	priedas. Vaistinis augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu.	75
8	priedas. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto.....	76
9	priedas. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas	77
10	priedas. Bendras fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje.	77
11	priedas. Chlorofilo <i>a</i> koncentracijos įvertinimas augaluose.....	78
12	priedas. Chlorofilo <i>b</i> koncentracijos įvertinimas augaluose.....	78
13	priedas. Chlorofilo karotinoidų koncentracijos įvertinimas augaluose	79
14	priedas. Liuteino koncentracijos įvertinimas augaluose.....	79
15	priedas. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas augaluose.....	80
16	priedas. Askorbo rūgšties kiekybinis įvertinimas.....	81
17	priedas. Baltymų koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje.....	82
18	priedas. <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas.	83
19	priedas. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas	83
20	priedas. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas	84
21	priedas. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas	85
22	priedas. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinis įvertinimas prieš <i>Xanthomonas campestris</i> ; <i>Rhizobium radiobacter</i> bakterijas.....	86

Santrumpų sąrašas

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfonrūgštes) radikalas;
BAP – 6-benzilaminopurinas;
DMSO – dimetilsulfoksidas;
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;
FRAP – geležies redukcijos antioksidacinė galia;
IAR – indolilacto rūgštis;
MDA – malondialdehidas.
MS – Murashige ir Skoog terpė;
NAR – 1-naftilacto rūgštis;
RDR – reaktyvios deguonies rūšys;
SOD – superoksido dismutazė;
TDZ – 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urėja;
TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas;
2,4-D – 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis.

Įvadas

Pastaruju metu vaistažolių pramonė yra viena iš intensyviausiai besivystančių pramonės šakų visame pasaulyje. Vartotojai tampa vis sąmoningesni dėl gyvenimo būdo pasirinkimo, o dėl šios priežasties didėja ir natūralių produktų paklausa. Pasaulio sveikatos organizacija apskaičiavo, kad vidutiniškai 65% žemyno gyventojų priklauso nuo augalinės kilmės preparatų [1]. Būtent antriniai metabolitai lemia vaistinių augalų bioaktyvumą, todėl šių junginių tyrimai per pastaruosius 50 metų labai išaugo dėl šių produktų būtinybės kasdieniniame gyvenime, sveikatos priežiūroje bei siekiant surasti platesnes pritaikymo ir efektyvesnio panaudojimo galimybes [2].

Notrelinių šeimos augalai, vaistinis šalavijas (lot. *Salvia officinalis* L.) ir pipirmėtė (lot. *Mentha piperita* L.) sintetina daugybę fitocheminių junginių (flavonoidų, triterpeninių rūgščių, fenolinių junginių, rauginių medžiagų, seskviterpenų), kurie terapiškai nuo seno pritaikomi, kaip priešuždegiminės medžiagos, o kai kurie iš šių junginių pasižymi svarbiu *in vitro* antibakteriniu aktyvumu ir antioksidaciniu potencialu, panašiu į žinomus natūralius antioksidantus, tokius kaip α -tokoferolis ar askorbo rūgštis. O tai yra aktualu pagrindinių pasaulio sveikatos problemų, tokių kaip, atsparumas antibiotikams ir padidėjusi ligų rizika susijusių su oksidaciniu stresu, kontekste [3].

Bioaktyviuosius junginius galima išskirti iš natūraliai augančių augalų, tačiau antrinių metabolitų komercinė gamyba yra ribota dėl regioninių ar aplinkos apribojimų. Taip pat, procesas, kol augalas užauga ir pasiekia norimo metabolito koncentraciją yra ilgas. Norint patenkinti rinkos paklausą, alternatyvus, tvarus, didelio masto būdas yra vaistažolių auginimas bei augalų antrinių metabolitų gamyba *in vitro*. Efektyvus fitocheminių junginių kaupimasis nediferencijuotuose augalų ląstelių kultūrose vyksta sukuriant optimalų hormonų ir mitybos balansą kietoje terpėje. Didžiausioje antrinių metabolitų gamybos etape kaliaus kultūros surenkamos, džiovinamos ir ekstrahuojamos [2]. *In vitro* sistemos turi nemažai privalumų, įskaitant augalų dauginimą kontroliuojamomis aplinkos sąlygomis be sezoninių apribojimų bei metabolitų gavimą pagal gerą gamybos praktiką. Be to, metodas draugiškas natūralioms nykstančių ar retų augalų rūšių populiacijoms [4].

Darbo tikslas - įvertinti bioaktyvumą, fitocheminius junginius šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir pipirmėtės (lot. *Mentha piperita* L.) augalų *in vitro* ir *in vivo* ekstraktuose.

Darbo uždaviniai:

1. įvertinti antioksidacinį aktyvumą pagal DPPH, FRAP, redukcinį, ABTS metodus;
2. nustatyti fitocheminius junginius (fenolinius junginius, flavonoidus, fenolines rūgštis);
3. ištirti chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų, liuteino, antocianinų, askorbo rūgšties, baltymų, *L*-prolino, malondialdehido koncentracijas;
4. įvertinti antioksidacinių fermentų (superoksido dismutazės, prolindehidrogenazės) aktyvumą;
5. nustatyti antibakterinį aktyvumą prieš gramneigiamas bakterijas.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Vaistinio šalavijo charakteristika

Vaistinis šalavijas (lot. *Salvia officinalis* L.) yra notrelinių (lot. *Lamiaceae*) šeimos, *Nepetoideae* porūšio, *Mentheae* grupės bei *Salvia* genties aromatingas augalas [5]. *Salvia* yra didžiausia *Lamiaceae* šeimos gentis, apimanti beveik 900 rūšių, iš kurių vaistinis šalavijas (lot. *Salvia officinalis* L.), išsiskiria didžiausiu eterinio aliejaus kiekiu, taip pat yra šimtmečius pasaulyje komerciškai auginamas dėl gydomųjų ir maistinių savybių [6,7]. *Salvia* genties augalai auga visame pasaulyje, o *S. officinalis* rūšis yra kilusi iš Viduržemio jūros ir Vidurio Rytų regionų. Šiandien jis natūralizuotas visame pasaulyje, ypač Šiaurės Amerikoje ir Europoje [8]. Tai vidutinio dydžio, diaugiametė, nuolat žaliuojanti krūminė žolė ar sumedėjęs krūmas, prie pagrindo turintis gumburinį ar keturkampį, ištisai plaukuotą stiebą su daugybe šakų. Rūšis gali užaugti iki 60–70 cm aukščio. Žydi vasaros pradžioje, o žiedai yra violetinės, margai baltos ir mėlynos spalvos, iki 3 cm ilgio, susitelkę į menturius po 7–10 žiedus [7]. Šalavijo lapai dažniausiai yra ovalūs ar pailgai lancetiški, 4–10 cm ilgio ir 1–4 cm skersmens, statūs kraštuose, pakraščiai dantyti, purūs [9]. Paviršiuje lapas raukšlėtas, plaukuotas, apatinėje pusėje atsikišusiomis gyslomis, o viršutinėje – įdubusiomis. Lapams būdinga nuo šviesiai žalios iki sidabro pilkos spalva [10]. Pagal mikroskopinius požymius vaistinio šalavijo lapo viršutinės epidermio ląstelės, žiūrint iš paviršiaus, turi nedaug žiotelių, ląstelių sienelės mažai vingiuotos ar tiesios, o apatinis epidermis, priešingai, turi daug žiotelių bei eterinio aliejaus liaukų, o ląstelių sienelės yra banguotos, mažai rangytos. Ant abiejų paviršių būna daugybė liaukinių ir paprastų plaukelių [11]. Apatiniame lapo paviršiuje gausu paprastų plaukelių, jie daugialąsčiai, o šių viršutinės ląstelės plonasienės, susisukusi, ilga ir dažniausiai smaili, apatinė – storasienė. Liaukiniai plaukeliai dažniausiai išsidėstę lapo pakraščiuose, prie gyslų ir yra dviejų rūšių: a) su vienąste, nedažnai dviląste apskritimo formos galvute ant vienąstės kojelės; b) turintys vienąstę arba atitinkamai dviląstę galvutę ant dviląstės ar triląstės kojelės [12]. Šalavijo augalui būdingas aromatingas kvapas ir šiek tiek kartus skonis [13]. Išdžiovinti šalavijo lapai naudojami, kaip vaistinė augalinė žaliava sergant nervų širdies ir kraujagyslių sistemos bei kvėpavimo takų ligomis [14]. Lapai surenkami augalams žydint ir džiovinami natūraliomis sąlygomis pavėsyje ar patalpose cirkuliuojant šiltu oru [15].

Vaistinės pipirmėtės charakteristika

Pipirmėtė, botaniškai žinoma kaip *Mentha piperita* L., yra daugiametė aromatinė žolė, priklausanti *Lamiaceae* šeimai, kilusi iš Europos, tačiau auginama Kanadoje, šiaurinėje JAV, Azijoje ir daugelyje kitų pasaulio vietų, išsiskirianti ilga, saugaus naudojimo vaistiniuose preparatuose istorija [16]. Tai yra natūralus, aloheksaploidas hibridas ($2n = 6x = 72$) iš *M. spicata* L. (šaltmetės, $2n = 48$) ir *M. aquatica* L. (vandens mėtų, $2n=96$). Augalas užauga nuo 45 iki 80 cm aukščio ir yra labai panašus į *M. spicata*, tačiau skiriasi platesniu žiedynu ir palyginti ilgais priešingai lancetiškais lapais [17]. Įprastai išsišakoję, keturbriauniai stiebai būna rusvi arba tamsiai violetiniai, tačiau kartais jie būna ir pilkai tomentoziniai [18]. Žiedai yra maži, tankiai suspausti bei vamzdiniai, šių spalvų diapazonas vyrauja nuo rausvos iki alyvinės spalvos [19]. Medicinine žaliava laikoma pipirmėtės lapai, kurie yra tamsiai arba šviesiai žali, apie 4,5 ilgio ir 2,3 cm pločio, lancetiški arba pailgo kiaušinio formos, dantytais kraštais bei smailia viršūne [20]. Stebint mikroskopiškai, lapo viršutinis epidermis, susideda iš pailgų, didelių epidermio ląstelių, vingiuotomis, vertikaliomis sienelėmis, turi mažai stomatų arba išvis jų neturi, taip pat jame randama nedaug liaukų trichomų. Mezofilą sudaranti palisadinė parenchima, apima koloninių ląstelių sluoksnį, kuriame gausu chloroplastų, o kempininė parenchima,

sudaryta iš 4–6 sluoksnių netaisyklingos formos chloroplastido turinčių ląstelių ir tarpląstelinį oro erdvių [21]. Lapo apatinio paviršiaus epidermio ląstelės labiau nelygiomis, tačiau taip pat vertikaliomis sienelėmis su daugybe žiotelių. Lapų gyslų ir vidurio srityje išsidėstę ne liaukų ir liaukų trichomai kaip ataugos. Ne liaukiniai trichomai vienerūšiai, papiloziniai sudaryti iš 1–8 ląstelių, o liaukų trichomose randama 1–2 ląstelių stiebas ir 1–8 ląstelių liaukinė galvutė, kurioje yra eterinio aliejaus ir nėra kalcio oksalato kristalų [22]. Terapiniais tikslais naudojami džiovinti lapai, kurių lakiųjų aliejų kiekis yra bent 1 %, o pipirmėtės farmakologinės savybės apima anestezinį, antihelmininį, priešgrybelinį, antimikrobinį bei antioksidacinį poveikį [23]. Derliaus nuėmimas gali būti atliekamas du kartus per metus birželį ir rugsėjį, visiškai subrendus žiedams. Džiovinama turi būti ne didesnėje nei 35 ° C temperatūroje, kad būtų išvengta lakumo [24]. Būtent dėl lakiojo aliejaus visam augalui būdingas labai aštrus mėtų kvapas [25].

1.2. Augalų kaliaus *in vitro* ir suspensinės kultūros augalų biotechnologijoje

Pastaruju metu augalų biotechnologijos siūlo patrauklias galimybes auginti *in vitro* ir suspensinės kultūras, kurios gali būti naudojamos tvariai bei didelio masto antrinių metabolitų gamybai farmacijos, maisto, kosmetikos ir kitose susijusiose pramonės šakose [26].

Kaliaus kultūra, tai nediferencijuota augalų ląstelių kultūra, indukuota kietoje gelio terpėje, kurioje yra santykinai nemaža augimo hormonų koncentracija. Beveik bet kuri augalo dalis gali būti naudojama šioms kultūroms kurti, o paimti eksplantai iš augalų audinių, lėtai išauga *in vitro* į ląstelių masę, kuri svyruoja nuo amorfinės ir bespalvės iki rusvos spalvos, jei ji gauta steriliomis sąlygomis, saugant nuo mikrobino užteršimo [27]. Žinomi penki kaliaus augimo etapai: vėlavimo etapas, kuomet ląstelės ruošiasi dalijimuisi; eksponentinis etapas, kada ląstelių dalijimosi greitis didžiausias; linijinis etapas, kai ląstelių plėtimosi greitis toliau didėja, nors ląstelių greitis suletėja; letėjimo etapas, kuomet ląstelių pailgėjimo ir dalijimosi greitis mažėja toliau; stacionarus etapas, kai ląstelių dydis bei skaičius išlieka pastovus [28]. Biologiškai aktyviomis medžiagomis gausios kaliaus kultūros, surenkamos konkrečioje augimo ciklo stadijoje, dažniausiai stacionarioje, nes jos metu antrinių metabolitų gamyba būna didžiausia. Žaliava toliau džiovinama, ekstrahuojama, o ekstraktas identifikuojamas siekiant kiekybiškai įvertinami jame esančius norimus, vaistinius junginius, naudojant spektrofotometrinius ar chromatografinius metodus [29]. Tolimesnis junginio kiekis didinamas perkeltant kaliaus kultūrą į kolbas bei suspensijas, o vėliau į tinkamai paruoštus bioreaktorius, siekiant maksimaliai padidinti produkto gamybą (žr.1.1 pav.).

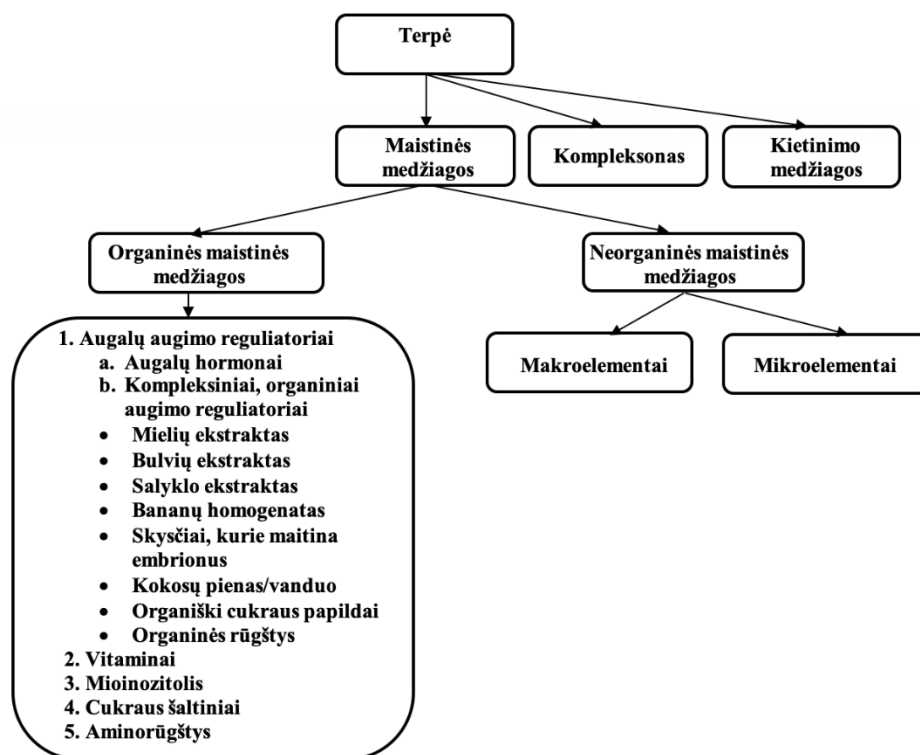


1.1 pav. Augalų, *in vitro* kultūrų sukūrimas, naudojant biotechnologinius metodus [30]

Būtent mitybinės terpės aprūpina kaliaus kultūras mineralais, vandeniu, augimo regulatoriais, hormonais, organiniais junginiais bei kitomis svarbiomis maistinėmis medžiagomis tolimesniam kultūrų vystymuisi į nediferencijuotą kaliaus masę bei šio augimui. Bene efektyviausia terpė *in vitro* kultūroms auginti laikoma Murashige ir Skoog (MS), išsiskirianti didele kalio, nitratų bei amoniako koncentracija ir ekonomišku. Tačiau, kai kurios augalų rūšys gerai auga paprastose terpėse, į kurių sudėtį įeina neorganinės maistinės medžiagos, augimo regulatoriai, anglies šaltiniai, kietinančios medžiagos, o kitoms rūšims papildomai reikia vitaminų ar aminorūgščių (žr.1.2 pav.) [28]. Terpėse naudojamus makroelementus apima magnio (Mg), azoto (N), fosforo (P), kalio (K), kalcio (Ca) bei sieros (S) druskos ir visos jos yra skirtingai svarbios vystymosi procese, pavyzdžiui, nukleotidų sintezę atlieka – N, P, S, ląstelės sienelės sintezę – Ca, baltymų sintezę – S, N, fermentų kofaktorių sintezę – Mg. Nors mikroelementai reikalingi mažais kiekiais, tačiau jie taip pat būtini augalų augimui, o svarbiausi iš jų yra divalenčiai metalų katijonai – cinkas, geležis, varis, manganas [31]. Siekiant optimalaus augimo, terpę būtina papildyti vitaminais, nes jie svarbūs medžiagų apykaitos procesuose kaip fermentų dalys ar kofaktoriai. Dėl dalyvavimo angliavandenių medžiagų apykaitoje, nikotino rūgštis, tiaminas, pantoteno rūgštis, mioinozitolis, piridoksinas yra dažniausiai naudojami vitaminai. Aminorūgščių pridėjimas padidina azoto tiekimą į terpę, o tai svarbu skatinant ląstelių augimą [32]. Augalų atsinaujinimui ir augimui yra būtini kompleksiniai augimo regulatoriai, kurie yra vitaminų, hormonų, riebalų rūgščių, aminorūgščių šaltinis. Norint, kad būtų užtikrinta pakankama aeracija, ruošiant pusiau kietą mitybinę terpę, turi būti naudojamos kietinimo medžiagos. Lyginant su kitomis medžiagomis, tokiomis kaip fitagelis ar agarozė dėl inertiškumo yra paminėtinas agaras [28]. Kaliaus kultūros kultivavimo sėkmė dažniausiai priklauso nuo augalų augimo regulatorių suderinamumo, bazinių terpių naudojimo, eksplantų vystymosi bei atitinkamų aplinkos sąlygų [33]. Tačiau reikšmingiausi veiksniai biotechnologinių kultūrų augimui, diferenciacijai, regeneracijai bei metabolitų susidarymui *in vitro* yra augimo regulatorių sąveika ir pusiausvyra egzogeniškai ir endogeniškai kultivuojamose ląstelėse [34]. Augimo regulatoriams priskiriamos natūralios hormoninės medžiagos (fitohormonai), taip pat jų sintetiniai analogai [35]. Yra penkios pagrindinės natūraliai atsirandančių augalų hormonų klasės, būtent, citokininai, auksinai, giberelinai, etilenas ir abscizo rūgštis. Auksino ir citokinino sąveika yra laikoma svarbiausia. Ji paprastai reikalinga organizuojant augalų organų ir audinių kultūrų vystymąsi, augimą [36]. Taigi tinkamų mitybos ir hormonų santykio sukūrimas padidina reikiamų metabolitų biosintezę augalų *in vitro* kultūrose ir taip užtikrina komercinių tikslų pasiekimą. O pagrindiniai pramoniniu lygiu svarbūs *Mentha piperita* L. ir *Salvia officinalis* L. kaliaus kultūrose kaupiami biologiškai aktyvūs junginiai pateikti 1.1 lentelėje.

Farmakologiškai naudingas, natūralus produktas išgaunamas iš šalavijų yra rozmarino rūgštis, kurio koncentracija nediferencijuotose augalų kultūrų lapuose dažnai būna didesnė nei augaluose *in vivo*. Šis aktyvus metabolitas standartiniu gavybos metodu išskiriamas naudojant maceracijos ar distiliacijos techniką, o šiuolaikiniu taikant superkritinę CO₂ ekstrakciją [40, 41]. Šalavijuose gausiausi monoterpenai – α -ir β -tujonas, kamparas ir 1,8-cineolis bei seskviterpenai – viridiflorolis, α -humulenai, išskiriami ekstrakcijos superkritiniais skysčiais metu, o šių bioaktyvių junginių išėiga reikšmingai lemia slėgis. Monoterpenų ekstrakcijai optimalus slėgis 15–20 MPa ribose, seskviterpenams esant mažiausiam 10 MPa [42]. Didelė tikslinių junginių išėiga pasiekama išskiriant *M. piperita* kaliaus kultūrų fenolines rūgštis (kavos, rozmarino rūgštį), flavonus (hesperidiną, apigeniną) ir hidroksicinamono rūgštis natūraliais giluminiais eutektiniais tirpikliais [43]. Mentolis,

limonenas, mentonas, cineolis, pulegonas dažniausiai išgaunami distiliacijos, superkritinės CO₂ ekstrakcijos metu, o atskiriami priešsrovine chromatografija [44].



1.2 pav. Kaliaus kultūrų pagrindiniai mitybinės terpės komponentai [28]

1.1 lentelė. *Mentha piperita* L. ir *Salvia officinalis* L. kaliaus kultūrose *in vitro* kaupiami biologiškai aktyvūs junginiai [37,38,39]

Ekstraktas	Komponentas	Kiekis %
<i>Mentha piperita</i> L.	Limonenas	± 3,80
	Mentonas	± 3,24
	Mentolis	± 7,21
	α-Pinenas	± 0,63
	β-Pinenas	± 0,43
	Metilacetatas	± 3,11
	Pulegonas	± 6,46
	Cineolis	± 6,61
<i>Salvia officinalis</i> L.	α-Pinenas	± 1,64
	β-Pinenas	± 0,46
	1,8-Cineolis	± 3,10
	cis-Tujonas	± 3,46
	trans-Tujonas	± 2,34
	Rosmarino rūgštis	± 5,1
	Kavos rūgštis	± 0,8
	Galo rūgštis	± 7,9
	Kamparas	± 5,66
	Borneolis	± 2,00
	Metileugenolis	± 19,80
	α-Humulenas	± 4,04
Apigeninas	± 0,8	

Reikia paminėti, kad suspensinės kultūros yra inicijuojamos iš kaliaus kultūrų, šių ląsteles suspenduojant skystoje terpėje, stiklinėse kolbose ir maišant tam tikru greičiu ant besisukančių ar horizontalių kratytuvų, kad ląsteles iš visų pusių pasiektų maistinė terpė, kuri galėtų apsaugoti

ląsteles nuo agregacijos bei padidintų maistinių medžiagų absorbciją, skatindama ląstelių augimą. O po šio proceso kultūras sėkmingai galima perkelti į specializuotą bioreaktorių [45]. Suspensijos kultūros yra efektyviausias antrinių metabolitų gamybos metodas dėl greito augimo ir didelio metabolizmo greičio su trumpesniais biosintezės ciklais sistemoje bei su tiksliu stebėjimu ir kontrole [46]. Nes augalų ląstelių suspensinių kultūrų metodas antriniams metabolitams gaminti pagrįstas augalų ląstelių biosintetinės totipotencijos koncepcija, kiekviena kultūros ląstelė išlaiko visą genetinę informaciją reikalingą visame augale esančių junginių gamybai [29].

Patys pagrindiniai augalų suspensinių kultūrinių sistemų pranašumai, lyginant su kitų rūšių kultūromis ir įprastais laukiniais augalais yra šie: pasirinktus augalų junginius galima išgauti nepriklausomai nuo išorinių veiksnių, nes kultūros yra mažiau linkusios į įvairius aplinkos pokyčius (pavyzdžiui, klimato ar dirvožemio sudėties); greitas augimas bei reprodukcija; kultūrinėms ląstelėms nėra vabzdžių ar mikroorganizmų grėsmės, taip užtikrinamos stabilios vienalyčio ir tolygaus derliaus gamybos platformos; sugeba susintetinti naujus produktus, kurių įprastai nėra vietiniuose augaluose; bet kurio augalo – net nykstančio ar reto – ląstelės gali būti paprastai palaikomos, kad susidarytų jų bioaktyvios medžiagos, be to, robotizuotas antrinių metabolitų gamybos valdymas sumažina išlaidas [47,48,49].

1.3. Biologiškai aktyvūs junginiai, fitochemikalai augaluose

Augalai yra įvairių cheminių junginių šaltinis, todėl jiems būdinga tam tikra medicininė reikšmė [50]. Šie junginiai augaluose sintetunami pirminiais ir antriniais metabolizmo keliais ir daugelis iš jų, atsižvelgiant į jų aktyvumą, gali būti suskirstyti į du tipus: neaktyviausias ir veikliąsias/aktyviausias sudedamąsias dalis [51]. Neaktyviosios sudedamosios dalys arba pirminiai metabolitai apibūdinami, kaip junginiai neturintys apibrėžtų terapinių verčių, tačiau gali būti naudingi, kaip pagalbinės medžiagos vaistų formuluotėje ar naudojamos chirurgijoje, pavyzdžiui, ligninas naudojamas baltymų nusodinimui ir emulsijų stabilizavimui ar krakmolos naudojamas, kaip tablečių užpildas, rišiklis [52]. Reikia paminėti, kad aktyviosios sudedamosios dalys arba antriniai augalų metabolitai turi šį poveikį ir yra skirstomi į kitas rūšis (flavonoidai, glikozidai, saponinai, alkaloidai, taninai, įvairūs fenoliniai junginiai, steroidai, terpenai), atsižvelgiant į jų chemines ir fizikines savybes [53]. Šios medžiagos aptinkamos kiekvienoje augalo dalyje – šaknyse, stiebuose, lapuose, žieduose, vaisiuose, tačiau skirtingais kiekiais [54]. Genetinis poveikis ir abiotinis (šviesa, dirvožemis, vanduo, chemikalai, druskos, temperatūra, geografinės variacijos) ir biotinis (virusai, bakterijos, parazitai, patogeniniai grybai) stresas, sąlygoja kiekybinius ir kokybinius vaistinių augalų veikliųjų sudedamųjų dalių pokyčius [55,56]. Daugelis šių cheminių medžiagų yra plačiai naudojamos maisto, kosmetikos ir farmacijos preparatuose bei yra labai paklausios ir ekonomiškai vertinamos [57].

1.3.1. Pirminiai metabolitai

Pirminiai metabolitai yra įvairių rūšių organiniai junginiai, kuriuos išskiria augalai, dalyvaujantys įvairiuose vystymosi, dauginimosi bei augimo procesuose, baltymų ir hormonų sintezėje, kvėpavime ir fotosintezėje [58]. Pirminių metabolitų yra beveik visose augalų rūšių dalyse, filogenetinėse grupėse. Šių metabolitų pavyzdžiai yra angliavandeniai - sacharozė, manitolis, fruktozė, gliukozė, stachiozė, sorbitolis ir ksilitolis; nekrakmolinės medžiagos apima ligniną; vitamino B kompleksai – riboflavinai, pantoteno rūgštis, tiaminai, niacinai, oleino rūgštis; askorbo rūgštis; organinės rūgštys; oksalo rūgštis; aminorūgštys, tokios kaip prolinai, histidinas, lizinas, argininas, leucinas, izoleucinas, triptofanas; ir nesočiosios riebalų rūgštys – mononesočiosios ir polinesočiosios [59].

1.3.2. Karotinoidai ir chlorofilas

Karotinoidų ir chlorofilo pigmentai kartu randami žaliuose augalų audiniuose, ypač augalų lapų chloroplastuose. Biologiškai karotinoidai saugo chlorofilą ir jo funkciją fotosintezėje, sugerdami, žalingą itin didelio intensyvumo šviesą. Augaluose nustatyta daugiau nei 700 karotinoidų formų, kurios yra atsakingos už raudoną, oranžinę ir geltoną spalvą daugelyje augalų, o iš šių plačiausiai paplitę – liuteinas ir β -karotenas [60,61]. Cheminiu požiūriu karotinoidai yra gaunami iš tetraterpenų, o tai reiškia, kad jie gaminami iš aštuonių izopreno molekulių, kuriose yra 40 anglies atomų [62]. Karotinoidai skirstomi į dvi klases, priklausomai nuo deguonies molekulės buvimo ar nebuvimo jų cheminėse struktūrose: karotenai (neturi deguonies) ir ksantofilai (turi deguonį). Šie pigmentai taip pat turi svarbių antioksidacinių savybių, kurios yra tiesioginis jų cheminės struktūros rezultatas. Pavyzdžiui, ksantofilai atlieka laisvųjų radikalų gaudytojų, veiksmingų RDR slopintojų ir grandinės nutraukiančių antioksidantų vaidmenį [63]. Be to, yra naudingi žmonių sveikatai kaip bioaktyvūs junginiai, turintys provitaminą A (β -kriptoksantiną ir β -karotoną) [64].

Chlorofilo svarba šviesos energijai sugerti augalų biosintezei yra gerai žinoma. Šis pigmentas saulės energiją verčia chemine energija, fotosintezės metu. Chemiškai chlorofilas yra porfirino pigmentas, kuriame yra magnio jonų. Augaluose jis egzistuoja šešiais skirtingais tipais, tačiau pagrindiniai, glaudžiai susiję yra chlorofilas *a* ir chlorofilas *b*. [65]. Šios formos skiriasi pagal metilo grupę chlorofile *a* ir formilo grupę chlorofile *b*. Pagrindinis fotosintezės pigmentas yra chlorofilas *a*, kuris yra pirminis elektronų donoras elektronų transportavimo grandinėje. Chlorofilas *b* yra papildomas pigmentas, nes jis nėra būtinas fotosintezei, o šio pagrindinė reikšmė – išplėsti organizmų absorbcijos spektrą [63]. Visi organizmai, atliekantys fotosintezę, turi chlorofilą *a*, bet ne visi organizmai turi chlorofilą *b*, šis dažniausiai randamas augaluose. Chlorofilo *a* ir *b* šviesos sugerties savybės skiriasi, chlorofilas *b* sugeria mėlyną šviesą, o chlorofilas *a* sugeria šviesą iš violetinės–mėlynos ir oranžinės–raudonos spektro sričių. Be to, *a* ir *b* santykis augaluose yra apie 3:1 [60]. Chlorofilai, be žalios spalvos, turi antioksidacinį ir antimutageninį aktyvumą, taip pat apsaugo nuo degeneracinių ligų [64].

1.3.3. Askorbo rūgštis

Askorbo rūgštis (vitaminas C) yra gausus augalų komponentas. Jis pasiekia daugiau nei 20 mM koncentraciją chloroplastuose ir randamas visuose ląstelių dalyse, įskaitant ląstelės sienelę ir trapląstelinę erdvę [66]. Šio vitamino kiekis labai skiriasi priklausomai nuo augalo rūšies [67]. Be to, vitamino C kiekis skirtinguose organuose ir audiniuose skiriasi: dažniausiai dideli kiekiai būna lapuose, meristematinuose audiniuose, žieduose ar jaunuose vaisiuose, o maži kiekiai randami nefotosintetinančiuose organuose, tokiose kaip šaknys bei stiebai [68]. Augalai askorbatą *de novo* sintetina daugiausia per Smirnoff-Wheeler kelią, dominuojantį fotosintezės audiniuose, kaip pradines medžiagas naudojant d-manozę ir l-galaktozę [69]. Vitaminas C augaluose dalyvauja įvairiuose procesuose, įskaitant fotoapsaugą, atsparumą aplinkos poveikiui, fotosintezę, ląstelių sienelių augimą bei antocianinų, hidroksiprolino sintezę [66]. Daugelis biologinių askorbato savybių atsiranda dėl jo gebėjimo redukuoti. Nuo šios savybės priklauso dviejų tipų biocheminis aktyvumas. Pirma, tai yra veiksmingas antioksidantas laisvųjų radikalų gaudytojas ir antioksidantas, apsaugantis ląstelių membranas, audinius ir deoksiribonukleorūgštį nuo oksidacinės pažaidos [70,71]. Antra, vitaminas reikalingas siekiant išvengti per didelio geležies oksidacijos nuo 2-oksoglutato priklausomose dioksigenazėse [71].

1.3.4. Peptidai (aminorūgštys)

Augalų ląstelėse esti nedaug baltymų, lyginant su gyvūnų ląstelėmis, daugiausia dėl didelio angliavandenių kiekio, kurie ir sudaro didžiąją augalo struktūros dalį. Tačiau baltymai ir aminorūgštys svarbios statybinės struktūros. Be baltymų sudedamųjų dalių vaidmens, aminorūgštys taip pat dalyvauja daugybėje ląstelių reakcijų, todėl jos veikia daugelį fiziologinių procesų, tokių kaip augalų vystymąsi ir augimą, tarpląstelinio pH kontrolę, medžiagų apykaitos, energijos arba redokso galios generavimą ir atsparumą biotiniam ir abiotiniam stresui [72,73]. Aminorūgščių katabolizmas rodo reikšmingus skirtumus tarp augalų rūšių, audinių ir vystymosi stadijų, todėl galima tikėtis, kad srautas per aminorūgščių katabolinius kelius labai pasikeis per visą augalo gyvavimo ciklą [74]. Tačiau reikia atsižvelgti į tai, kad augaluose, taip pat gaminama šimtai aminorūgščių, nedalyvaujančių peptidų sintezėje, kai kurios aminorūgštys (pavyzdžiui, prolino serinas, leucinas) pačios veikia kaip signalinės molekulės, o kitos yra fitohormonų ar kitų antrinių metabolitų, turinčių signalinę funkciją, sintezės pirminės medžiagos [75]. Be to, šios aminorūgštys naudojamos gynybinėms funkcijoms, tokioms kaip kenkėjų, žolėdžių bei patogenų atgrasymui arba alelopatijai [76]. Peptidai, kurie sudaryti iš tirozino, triptofano, prolino, histidino yra stiprūs antioksidantai. Hidrofobinės aminorūgštys, esančios peptidų struktūroje veikia jų antioksidacinį aktyvumą bei gebėjimą slopinti lipidų peroksidaciją, o sieros turinčios aminorūgštys reguliuoja redokso reakcijas, RDR ir ksenobiotikų šalinimą [77]. Prolinas yra aminorūgštis, kuri didelėmis koncentracijomis kaupiasi augaluose įvairiomis streso sąlygomis. Prolino kaupimasis yra glaudžiai susijęs su daugeliu ląstelių procesų, tokių kaip maistinių medžiagų prieinamumas, energijos būklė, osmosinis slėgis, redokso balanso pokyčiai ir apsauga nuo patogenų [78]. Prolino biosintezė ir katabolizmas yra atitinkamai susiję su mitochondrijų kvėpavimu ir fotosintezė. Prolinas gali veikti kaip signalas, moduluojantis genų ekspresiją ir tam tikrus medžiagų apykaitos procesus [79]. Keletas tyrimų priskyrė prolino antioksidacinę savybę, o tai rodo, RDR šalinimo aktyvumą ir prolino veikimą kaip atskirą deguonies slopintoją [80]. Veikimas prolino gali sumažinti RDR kiekį augaluose, taip išvengiant užprogramuotos ląstelių žūties. Be to, ši aminorūgštis gali apsaugoti žmogaus ląsteles nuo kancerogeninio oksidacinio streso ir gali sumažinti lipidų peroksidaciją ląstelėse, veikiamose sunkiųjų metalų [81, 82].

1.3.5. Antriniai metabolitai

Aukštesni augalai sintetina virš 200 000, mažos molekulinės masės, specializuotų cheminių medžiagų, antrinių metabolitų [83]. Trys pagrindiniai antrinių metabolitų tipai augaluose, atsižvelgiant į jų biosintezės kelią yra fenoliai, terpenai bei azoto/sieros turintys junginiai [84]. Antriniai metabolitai atlieka keletą svarbių funkcijų: jie padeda apsisaugoti nuo žolėdžių ir mikrobinių infekcijų, veikia kaip signalai simbiotinėms bakterijoms, apdulkintojams, apsaugo augalus nuo abiotinio streso, pavyzdžiui, ultravioletinės spinduliuotės, yra endogeniniai augalų augimo reguliatoriai [85]. Šios cheminės medžiagos dažnai yra nuodingos, tačiau taip pat naudojamos žmonių sveikatai gerinti, kaip maisto papildai, vaistai ir funkcinis maistas [86].

1.3.6. Fenoliniai junginiai

Augalų fenoliniai junginiai yra antriniai metabolitai, apimantys kelias struktūriškai skirtingas natūralių produktų klases, kurios biogenetiškai susintetinamos šikimato ar fenilpropanoidų keliu [87]. Fenoliniai junginiai turi bendrą cheminę struktūrą, sudarytą iš aromatinio žiedo su vienu ar daugiau hidroksilo grupių, o pagrindinės fenolinių junginių grupės yra flavonoidai, taninai, fenolio

rūgštys, lignanai, ir stilbenai [88]. Taip pat, augaluose, svarbūs fenoliniai junginiai, priklausantys flavonoidų šeimai – antocianinai, sudarantys didžiausią vandenyje tirpių pigmentų grupę [89]. Šie junginiai yra plačiai pasiskirstę fitochemikalai, dažniausiai sintetinami augalų viduląsteliniam endoplazminiame tinkle ir laikomi vakuolėse bei epidermio ir poepiderminių ląstelių sienelėse [90]. Be to, augaluose esantys fenoliniai junginiai gali būti skirstomi į konstitucinius arba indukuotus. Konstituciniai fenoliniai junginiai yra iš anksto susiformavę augaluose, dažniausiai sintetinami šiam augant ir vystantis, o indukuoti fenoliniai junginiai sintetinami reaguojant į biotinį ir abiotinį stresą [91]. Šalavijų lapuose buvo nustatyta apie 160 polifenolinių junginių, kuriuos galima suskirstyti į fenolines rūgštis ir flavonoidus. Sarhan ir kt. [92] nustatė fenolines rūgštis, esančias *S. officinalis*, tai: rozmarino rūgštis, salvianolio rūgštis, chlorogeno rūgštis ir cinamono rūgštis. O šešis svarbiausius flavonoidus sudaro hispidulinas, luteolino 7-O-gliukozidas, apigeninas, cirsimaritinas, kaempferolis ir kvercetas [93]. Pagrindiniai pipirmėčių fenoliniai junginiai, lemiantys farmakologinį aktyvumą yra fenolinės rūgštys (ypač rozmarino rūgštis) ir flavonoidai (eriodiktilolis, luteolinas, apigeninas ir jų glikozidai) [94]. Fenoliniai junginiai yra stiprūs antioksidantai (hidroksilo grupės yra atsakingos už laisvųjų radikalų pašalinimą) ir antimikrobiniai junginiai, pasižymi estrogeniniu, grybelinių toksinų aktyvumu, antikancerogeniniu potencialu, turi priešuždegiminių, imunomoduliuojančių savybių bei apsaugo nuo širdies ir kraujagyslių ligų, todėl gali būti naudojami įvairiose srityse, pavyzdžiui, farmacijos ir maisto pramonėje [95].

1.3.7. Terpenai

Terpenai priklauso didžiausiai antrinių metabolitų klasei ir iš esmės susideda iš penkių anglies izopreno vienetų, kurie tūkstančiais būdų sujungiami vienas su kitu ir yra gaminami augalų ląstelių citoplazmoje [96]. Jie skirstomi į šias klases pagal penkių juose esančių anglies izopreno vienetų skaičių ir struktūrinę organizaciją: hemiterpenai (C5), monoterpenai (C10), seskviterpenai (C15), diterpenai (C20), sesterterpenai (C25), triterpenai (C30) ir karotenoidai. (C40) [97]. Be to, terpenai sintetinami iš universalių, šakotųjų, nesočiųjų difosfato izopreno vienetų: izopentenilpirofosfato ir jo funkcinio izomero dimetilalilpirofosfato [98]. Augaluose terpenoidų metabolitai naudojami įvairioms pagrindinėms augimo ir vystymosi funkcijoms, tačiau dauguma terpenoidų naudojami specializuotai cheminei sąveikai ir apsaugai abiotinėje ir biotinėje aplinkoje [99]. Vyraujantys mediciniškai vertingi metabolitai *S. officinalis* yra monoterpenai - α - ir β - tujonas, borneolis bei 1,8-cineolis, kuriems būdingas veiksmingas antibakterinis ir priešgrybelinis aktyvumas [100]. Taip pat dažnai randami diterpenai – karnozolis, karnozo rūgštis, metilkarnozatas ir triterpenai – urzolio ir oleano rūgštis. Šalavijo antioksidacinis aktyvumas itin priklauso nuo minėtų fenolinių diterpenų, ypač karnozolio ir karnozo rūgšties [101]. Pagrindiniai terpeno komponentai randami pipirmėtėse yra mentonas, mentolis, limonenas, karvonas, α - ir β - pinenas, cineolis, kurie yra aktyvūs stimulatoriai, antiseptikai, pasižymintys antibakterinėmis, antivirusinėmis, antioksidacinėmis savybėmis bei turi virškinimą gerinantį bei raminamąjį poveikį [102, 103].

1.3.8. Glikozidai

Glikozidai yra molekulės sudarytos iš dviejų chemiškai ir funkciškai nepriklausomų dalių – glikono vieneto, kuris yra hidrofiliškas ir aglikono vieneto, kuris yra lipofiliškas. Glikozide sacharido dalis yra sujungta su aglikono dalimi glikozidiniu ryšiu, kuris yra jautrus hidrolizei ir nestabilus [104]. Augaluose glikozidai daugiausia gaunami modifikavus antrinius metabolitus, katalizuojamus augalų fermentų, glikoziltransferazių [105]. O jie yra saugomi vakuolėje, tačiau augalui susidūrus su stresu, metabolitai išskiriami bei citoplazmoje esantys fermentai suaktyvėja [106]. Daugelis augalų kaupia

chemines medžiagas neaktyvių glikozidų pavidalu, kurie gali būti suaktyvinti fermento hidrolizės būdu. Dėl šios priežasties dauguma glikozidų gali būti laikomi provaistais, nes jie lieka neaktyvūs iki tol, kol yra hidrolizuojami ir išskiriamas aglikogenas, aktyvioji sudedamoji dalis [107]. Įprastai glikozidai gali būti klasifikuojami atsižvelgiant į glikono arba aglikono komponentą bei glikozidinę jungtį. Šie junginiai turi dokumentuotą medicininę vertę ir toliau klasifikuojami į širdies, alkoholinius, antrachinono, flavonoidų glikozidus [108]. *S. officinalis* dažniausiai randami natūralūs glikozidai, tokie kaip flavonoidiniai glikozidai, kardialiniai glikozidai ir saponinai, o *Mentha piperita* L. labiau būdingi flavonoidiniai glikozidai (eriocitrinas, hesperidinas, narirutinas, luteolin-7-O-rutinozidas, rozmarino rūgštis, diosminas) [109, 110]. Be to, molekulės turi daugybę svarbių poveikių gyviems organizmams, įskaitant antioksidacinį, antidiabetinį, priešušdegiminį, antihipertenzinį [111].

1.3.9. Eteriniai aliejai

Eterinis aliejus yra sudėtingas kelių lakiųjų sudedamųjų dalių, įskaitant monoterpenus, seskviterpenus, aldehidus, ketonus, alkoholius ir esterius, mišinys [112]. Šiuos aliejus sintetina bei išskiria liaukų trichomos bei kitos sekrecijos struktūros, specializuoti sekretoriniai audiniai, dažniausiai išsiskleidę ant augalų organų, ypač lapų ar žiedų paviršiaus [113]. Lakiųjų aliejų išeiga augaluose svyruoja plačiame diapazone – 0,05–18,0% [114]. Eteriniai aliejai gali būti išgaunami iš įvairių tam tikrų augalų rūšių ir jų dalių, tokių kaip lapai, žiedai, stiebai, žievė, šaknys, sėklos, pumpurai, vaisiai, kurių kiekviena turi specifinį terapinį ir energetinį poveikį [115]. Augaliniai komponentai prieš ekstrakciją yra tinkamai apdorojami, kad būtų gauti eteriniai aliejai, kuriuose įprastai nėra krakmolo, celiuliozės, taninų gliceridų, cukrų, mineralų ir druskų [114]. O šiems aliejams išgauti plačiai naudojami keli skirtingi ekstrahavimo būdai: įprastiniai – distiliavimas garais, ekstrahavimas tirpikliu bei alternatyvūs – ekstrahavimas ultragarsu, mikrobangomis bei superkritiniu skysčiu [116]. Aliejuje, išgautame iš *S. officinalis*, randama daugiau kaip 120 komponentų. Pagrindiniai veiklieji augalo komponentai yra: borneolis, kamparas, kariofilenas, cineolis, elementas, humulenai, ledenas, pinenas ir tujonas, be to, kai kurių iš šių medžiagų yra be galo maži kiekiai, todėl cheminiu būdu pagaminti tokių aliejų praktiškai neįmanoma [117]. Vaistinio šalavijo eterinis aliejus turi platų terapinį poveikį, yra plačiai naudojamas gydant medžiagų apykaitos ir endokrininės sistemos, nervų, kvėpavimo bei virškinimo sistemos ligas, širdies ir kraujotakos sutrikimus [118]. Taip pat tyrėjų ataskaitos apie *Mentha piperita* L., atskleidė, kad daugumoje aliejų yra daug 1,8-cineolio, mentolio, mentono, limoneno, pulegono bei karvono, suteikiančių šiam eteriniam aliejui, pagrindinius biologinius poveikius, tokius kaip – tonizuojantį virškinimą, diuretinį, priešušdegiminį, priešinfekcinį, antioksidacinį, antispazminį, analgetinį, su stresu susijusių simptomų mažinimą [119, 120].

1.4. *Salvia officinalis* ir *Mentha piperita* antioksidacinė veikla

Reaktyviosios deguonies rūšys (RDR) yra bendras terminas, vartojamas žymėti laisvuosius radikalus, įskaitant hidroksilo radikalą ($\bullet\text{OH}$), superoksido anijonų radikalą ($\text{O}_2^{\bullet-}$), alkoksilo radikalą ($\text{RO}\bullet$) ir peroksilo radikalą ($\text{ROO}\bullet$) [121]. Radikalai gali priimti arba atiduoti elektronus kitoms molekulėms, taip parodydami redukcines/oksidacines savybes [122]. Šiuos radikalus fiziologiškai gamina aerobiniai organizmai, beveik visose tarpląstelinėse organelėse ląstelėje, įskaitant, citozolį, membraną, branduolį, mitochondrijas, endoplazminį tinklą, peroksisomas, goldžio aparatą [123]. Esant normalioms ląstelių sąlygoms, metabolizmo metu RDR yra sintetamos mažomis ar vidutinėmis koncentracijomis ir vykdo daugelį svarbių ląstelių funkcijų, tokių kaip augimas, genų

aktyvinimas, signalinės molekulės bei fiziologiniai procesai, tokie kaip uždegimas [124]. Tam, kad būtų užtikrintas RDR balansas, organizmai sukūrė antioksidacinę sistemą susidedančią iš įvairių fermentų (superoksido dismutazės, katalazės, glutationo peroksidazės) ir neenziminių antioksidantų, galinčių išlaikyti ląstelių homeostazę. Tačiau atsiradus ligai, pataloginėms sąlygoms ar oksidacinį stresą sukeliantiems veiksniams (sunkiesiems metalams, ultravioletinei ir jonizuojančiajai spinduliutei), RDR lygis didėja, yra išsekvojami antioksidantai ir taip sukeliama iškreipta homeostazė [125]. Nedidelis šios pusiausvyros poslinkis link oksidacinio streso suaktyvina kelis signalinius kelius, kurie sukelia DNR pažeidimus, mutagenezę, padidina ląstelių proliferaciją ir sustiprina Warburg metabolinį poveikį, kurį naudoja vėžio ląstelės [126]. Eigoje pažeidžiami gyvybiškai svarbūs procesai, tokie kaip replikacija, tranckripcija, transliacija, padažnėja mutacijos, ląstelių žūtis, įvairūs patologiniai procesai bei greitėja senėjimo procesai [127]. Būtent antioksidantai yra junginiai galintys netiesiogiai arba tiesiogiai veikti ląstelių redokso balansą [128]. Pavyzdžiui, antioksidacinės, augaluose esančių flavonoidų ir fenolių savybės yra susijusios su jų radikalų šalinimo gebėjimu, metalų redukavimu aktyvumu ir metalų chelatinimu, kurie dalyvauja formuojant reaktyvius hidroksilo radikalus. Šios savybės atsiranda dėl polifenolinės cheminės struktūros, kurią sudaro C6-C3-C6 žiedų sistema [129]. Be to, antioksidacinės savybės priklauso nuo hidroksilo grupių padėties bei skaičiaus struktūroje, nes kai kurie radikalai redukuojami dėl protonų perdavimo per homolizinį katecholines grupės (3'-OH ir 4'-OH), esančios kai kuriose flavonoidinėse struktūrose, skilimą [130]. Tačiau, nors kateholio dalis yra svarbus antioksidacinio aktyvumo reikalavimas, kai kurie flavonoidai, neturintys katecholinių grupių, taip pat pasižymi puikomis radikalų šalinimo savybėmis dėl gebėjimo perkelti vandenilio atomus arba vienu metu vykstančio vandenilio/elektronų perdavimo arba nuoseklaus elektronų perdavimo su protonų praradimu. [131]. Antioksidaciniam pajėgumui įtakos turi ir augaluose esantys fermentai, pavyzdžiui superoksido dismutazė verčia superoksido anijonų radikalus į O_2 ir H_2O_2 , glutationo reduktazė, katalazė neutralizuoja H_2O_2 į vandenį ir deguonį [132].

Taigi, Kammoun [133] įvertino šalavijo lapų antiradikalinį aktyvumą lyginant su vitaminu C ir atskleidė, kad tirtas mėginys veiksmingai pašalina DPPH laisvuosius radikalus, kurių pusė didžiausios slopinančios koncentracijos vertė $8,31 \pm 0,55$ mg/l, panaši į gryno junginio vitamino C – $4,68 \pm 0,12$ mg/l. O šis svarbus augalo antioksidacinis aktyvumas siejamas su dideliu 1,8-cineolio kiekiu bei kitų reikšmingų komponentų – α -pineno, linalolio, žinomų dėl stiprių laisvųjų radikalų inaktyvavimo savybių. Kita mokslininkų grupė susiejo šalavijo kaliaus antioksidacinę veiklą su rozmarino ir kavos rūgšties buvimu. Šios rūgštys parodė stiprią laisvųjų radikalų šalinimo veiklą DPPH ir superoksido anijonų radikalams (rozmarino rūgštis DPPH (EC_{50}) – 0,21; SOD (vnt/mg) – 230; kavos rūgštis – DPPH (EC_{50}) – 0,24; SOD (vnt/mg) – 260) [134]. Atliktame FRAP tyrime *Salvia officinalis* lapų metanolio-acetono ekstraktas parodė puikias savybes veikiant prieš oksidacinį stresą – FRAP (mM Fe^{2+}/l) 300 ± 26 . Tyrime dėmesys kreiptas ir į derliaus nuėmimo laiką, todėl padaryta išvada, kad liepos mėnesį augale randama didžiausia polifenolinių junginių koncentracija [135]. Be to, Abdelkaderis [136] baigė savo tyrimus, įrodydamas, kad didelė polifenolio koncentracija *S. officinalis* lapų ekstraktuose yra atsakinga už stiprią antioksidacinę veiklą, lyginant su standartinių junginių, tokių kaip askorbo rūgštis ir butilinto hidroksitolueno poveikiu. Taip pat *in vitro* antioksidacinio aktyvumo tyrimai buvo atlikti siekiant įvertinti septynių augalų ekstraktų gebėjimą neutralizuoti laisvuosius radikalus, įskaitant DPPH radikalą bei gebėjimus redukuoti geležį. Šalavijų lapams buvo nustatytas geriausias antioksidacinis pajėgumas, naudojant DPPH (92,91 % IC_{50}) ir FRAP redukcinės galios (458,26 μ mol/L) tyrimus, reikia paminėti, kad pipirmėčių ekstraktas

pasižymėjo silpnesniu DPPH radikalų šalinimo gebėjimu (90,05 %IC₅₀) ir geležies redukcine galia (184,22 μmol/L) [137].

Pipirmėtės antioksidacinis aktyvumas, taip pat teigiamai koreliuoja su fenolinių junginių kiekiu. Įvertinus skirtingų pipirmėtės lapų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą naudojant DPPH tyrimą, buvo pastebėta, kad chloroformo ekstrakto aktyvumas buvo didžiausias (~91,8 %), o vandeninio ekstrakto – mažiausias (~70 %) [138]. Pipirmėtė atskleidė antioksidacinį aktyvumą, kuris galėjo atsirasti dėl didelio deguonies prisotinto monoterpeno kiekio, daugiausia 1,8-cineolio, mentolio, mentofurano ir pulegono [139]. Pipirmėtės antioksidacinį aktyvumą patvirtino ir Kaur [140] ištyręs pipirmėtės eterinio aliejaus ABTS ir DPPH radikalų pašalinimo aktyvumą, esant skirtingoms koncentracijoms, o rezultatų vertės svyravo nuo 17,24 iki 49,07% ABTS ir nuo 35,16 iki 60,70% tiriamojo DPPH.

1.5. Antimikrobinis *M. piperita* ir *S. officinalis* poveikis

Šiuo metu antibiotikai yra dažniausiai vartojami vaistai nuo bakterinių infekcijų, tačiau kelių tipų bakterijos gali sukurti atsparumą šiai priemonei, be to preparatai turi šalutinių poveikių ir yra brangūs dėl šių priežasčių svarbu ieškoti naujų, alternatyvių ir saugesnių natūralių antimikrobinų medžiagų [141]. Augalų bioaktyvūs junginiai veikia ne tik kaip natūralios priemonės įvairioms ligoms gydyti, bet ir gali būti prototipas kuriant naujus, efektyvesnius ir saugesnius vaistus [95]. Ištirtas augalinių ekstraktų bioaktyvių junginių, dalyvaujančių jų antimikrobiniame poveikyje, veikimo mechanizmas apima: bakterijos ląstelės sienelės sintezės slopinimą, jos irimą, plazminės membranos pažeidimą, veikimą prieš membranos baltymus, tarpląstelinio turinio išskyrimą, protonų varomosios jėgos išsekimą [142]. Svarbu atsižvelgti į bakterijų ląstelių paviršiaus struktūras, nes gramteigiamose bakterijose ląstelių sienelėje yra daugiau peptidoglikano, dėl to šių mikroorganizmų sienelės yra standesnės ir storesnės nei gramneigiamų analogų. Tačiau gramteigiamos bakterijos neturi svarbios išorinės lipidinės membranos, kurią turi gramneigiamos bakterijos, šiom suteikiančios didesnę atsparumą antibiotikams ar bioaktyviems junginiams [143]. Pavyzdžiui, fenoliniai junginiai pasižymintys antimikrobinėmis savybėmis prieš įvairius mikroorganizmus stipriau veikia gramteigiamas bakterijas, tačiau pakaitų tipas, skaičius bei padėtis fenolio junginių benzeno žiede ir šoninių grandinių ilgis turi įtakos jų bioaktyvumui [142]. Rashid [144] atliktame agaro disko difuzijos tyrime nustatė, kad pipirmėtės lapų ekstrakto antibakterinis potencialas skyrėsi priklausomai nuo naudojamo tirpiklio, nes heksano ekstraktas efektyviausiai slopino *E. coli* (14 ± 0.29 mm), chloroformo – *X. campestris* (11 ± 0.16), butanolio – *S. aureus* (14 ± 0.25 mm) bakterijas. Rezultatuose patvirtintas augalo antimikrobinis aktyvumas ir manoma, kad antibakterinis pipirmėtės aktyvumas susijęs su didele mentolio, fenolių ir flavonoidų koncentracija, tačiau negalima atmesti ir kitų pipirmėtės ekstraktų sudedamųjų dalių sinerginio poveikio. Taip pat pipirmėčių aliejaus šulinėlių difuzijos metodu patvirtinta, kad abi tirtos gramteigiamų bakterijų rūšys (*S. pyogenes* ir *S. aureus*) buvo jautrios *M. piperita* eteriniam aliejui su slopinimo zonomis atitinkamai 13,1 mm ir 17,2 mm, o gramneigiamų (*Escherchia coli* ir *Klebsiella pneumonia*) bakterijų slopinimo zona svyruoja nuo 5,1 iki 12,4 mm. Taigi eterinis aliejus yra veiksmingas tiek prieš gramteigiamas, tiek prieš gramneigiamas bakterijas, tačiau efektyvesnis prieš gramteigiamus organizmus. Be to, tvirtinama, kad lipopolisacharidai esantys gramneigiamų bakterijų išorinėje membranoje gali būti atsakingi už jų padidėjusį atsparumą antibakterinėms medžiagoms [145]. Šalavijų eterinio aliejaus ir jo emulsinių formų poveikis, svarbių patogenų augimui, buvo ištirtas Yazgan [146]. Aliejus buvo itin veiksmingas *K. pneumoniae* ir *P. damsela*, kurių slopinimo zonų reikšmės buvo didelės – 17,25 ir 19,00 mm. Nanoemulsija buvo veiksminga *S. aureus*, *S. paratyphi A* ir *P. mirabilis*, kurių slopinimo zonų skersmuo buvo 12,63, 12,00 ir 12,25 mm. Be to, dabartiniuose tyrimuose buvo pastebėta, kad šalavijų

eterinis aliejus yra šiek tiek veiksmingesnis tirtiems mikroorganizmams nei jo nanoemulsijos forma diskinės difuzijos metodu. Tačiau taikant mikro praskiedimo metodą, tiek nanoemulsijos forma, tiek eterinis aliejus turėjo panašų poveikį patogenų bakterijų augimui. Šį skirtumą galėjo lemti lėtesnis polinių junginių, kurių auginimo terpėje yra mažiau, plitimas. Ghzelbash [147] disko difuzijos metodu atliktu bandymu patvirtino, kad *Salvia officinalis* augalas gali būti naudojamas kaip natūralus antimikrobinis produktas. Bandyme, acetono ir etanolio (70%) ekstraktai sukūrė slopinimo zonas prieš gramteigiamas *B. anthracis* (12-25mm), *B. cereus* (7-14mm) ir *S. aureus* (7-17mm), taip pat prieš gramneigiamas bakterijas *E. coli* (7-11 mm), o šalavijo lapų acetono ekstraktai pasižymėjo stipriausiu antibakteriniu aktyvumu.

1.6. Vaistinio šalavijo panaudojimas medicinoje

Keletas farmakologinių tyrimų parodė, kad vaistinis šalavijas turi skirtingą biologinį poveikį, kurį lemia jų aktyvūs komponentai, tokie kaip fenoliai, flavonoidai, terpenoidai ir yra pritaikomas medicininiais tikslais [148]. Atsižvelgiant į farmakologinį *S. officinalis* poveikį centrinei nervų sistemai, įskaitant, neuroprotekcinį ir atmintį gerinantį, pagrįsta, kad šios rūšies augalai pasižymi teigiamu poveikiu smegenų išemijai, depresijai bei atminties gerinimui [149]. Šalavijas šimtmečius buvo rekomenduojamas kaip susilpnėjusių ar prarastų psichikos funkcijų atkūrimo priemonė, pavyzdžiui, sergant Alzheimerio liga dėl savo sudėtyje turimų flavonoidų ir fenolinių junginių, laikomų stiprių acetilcholino inhibitorių [150, 151]. Šio augalo ekstrakto veiksmingumas ir saugumas pacientams, sergantiems lengva ar vidutinio sunkumo Alzheimerio liga, placebo kontroliuojamo klinikinio tyimo metu, buvo vertintas keturių mėnesių laikotarpiu naudojant fiksuotą dozę. Rezultatai parodė, kad praėjus suplanuotam tyrimo laikotarpiui *S. officinalis* ekstraktas naudojamas 60 lašų per parą suteikė žymiai geresnius kognityvinės funkcijos rezultatus nei placebo klinikinės demensijos vertinimo skalėje [152]. Alzheimerio ligos atveju fermentas acetilcholinesterazė veikia acetilcholino, neuromediatorių, medžiagos dalyvaujančios perduodant signalą tarp sinapsių, inaktyvavimą ir skaidymą, o acetilcholino inhibitoriai daro poveikį neutralizuodami šios medžiagos trūkumą ir didinant jos kiekį smegenyse. Nustatyta, kad vaistinio šalavijo 0,5 mg/ml koncentracijos eterinis aliejus efektyviai slopina 46% acetilcholino aktyvumo ir yra veiksmingas inhibitorius [153]. *S. officinalis* vartojimas, kaip antidiabetinės medžiagos taip pat yra pagrįstas ir šio augalo ekstraktai pasižymi nuo dozės priklausomu aktyvumu, kuris yra panašus į standartinį vaistą nuo diabeto - gliubenklamidą. Tyrime 14 dienų vartojant 0,2 ir 0,4 g/kg kūno masės šalavijo ekstrakto, jis reikšmingai sumažino gliukozės, bendro cholesterolio, trigliceridų, kreatino, šlapimo rūgšties kiekius ir padidino insulino kiekį plazmoje [154]. Augale esantys bioaktyvūs junginiai veikia insulino receptorius, peroksisomų proliferatoriaus aktyvuoto gama receptorių, baltymų tirozino fosfatazes ir adenosino monofosfato aktyvuotos baltymų kinazes, be to palaiko gliukozės metabolizmo kepenyse reguliavimą, angliavandenių virškinimą, insulino sekreciją, gliukozės įsisavinimą bei β-ląstelių proliferaciją ir apoptozę [155]. Teigiamas šalavijo ekstrakto tablečių veiksmingumas pastebėtas ir mažinant tipiškus simptomus moterims menopauzės laikotarpiu. Keturių savaičių trukmės bandyme atliktame su 80 moterų, 45–65 metų, šioms skiriant Menosan® tabletes (3400 mg šviežiai nuskintos *Salvia officinalis* L., etanolio ekstrakto) arba placebo, preparatas 39,2% sumažino karščio bangų sunkumus bei 55,3% naktinį prakaitavimą, o *Salvia* veiksmingumo ryšys siejamas su pakitusiomis smegenų bangomis, kaip rodo spektrinės galios tankio intensyvumas [156]. Taip pat, *S. officinalis* turi reikšmingą antinociceptinį ir priešuždegiminį poveikį cheminiams elgesio modeliams susijusiems su opioidų mechanizmu. Pelės buvo gydomos hidroalkoholiniu šalavijo lapų ekstraktu sukeliant nociceptinį atsaką cheminiais agentais, taip pat eksperimente išmatuotas bendras leukocitų

kiekis ir plazmos ekstravazacija, sukelta acto rūgšties. Ekstrakto vartojimas sumažino acto rūgšties sukeltą raukšlių skaičių, plazmos ekstravazaciją ir bendrą leukocitų skaičių, uždegiminę ir neurogeninę fazę. Manoma, kad augale esančios oleanolio ir ursolio rūgštys prisideda prie ekstrakto antinociceptinių savybių dėl moduluojančio poveikio laikino receptorių potencialų katijonų kanalui [157].

1.7. Vaistinės pipirmėtės panaudojimas medicinoje

Šiuo metu pipirmėčių eterinis aliejus gali būti laikomas įvairių, žmonių ligų gydymo agentu. *Mentha piperita* daugelį metų yra naudojama virškinamojo trakto sutrikimams gydyti. Metilo salicilatas ir mentolis, pagrindinės veikliosios medžiagos, kurios veikia antispazmiškai, ramina skrandį ir virškinamąjį traktą. Fiziologinį poveikį, mažinant lygiųjų raumenų susitraukimą ir atpalaiduojant, lemia mentolio, kaip kalcio kanalų blokatoriaus, poveikis lygiųjų raumenų ląstelėms [158]. Be to, buvo pranešta, kad *M. piperita* turi poveikį serotonino, histamino bei virškinimo trakto cholinerginiams receptoriams, kurie taip pat gali lemti kai kuriuos jo antiemetinius poveikius [159]. Ištyrus 190 pacientų, sergančių dirgliosios žarnos sindromu, kurie vartojo 182 mg per parą nuo pH priklausiančio, žarnyne tirpinančio pipirmėčių aliejaus preparato arba placebo, 64% vartojusių pipirmėčių aliejų pajuto pilvo skausmų sumažėjimą, lyginant su 22% vartojusių placebo [160]. Pipirmėčių aliejus taip pat gali būti naudojamas vietiskai galvos skausmui mažinti. Dvigubai aklu, placebo kontroliuojamu kryžminiu tyrimu, kuriame dalyvavo 40 pacientų, *M. piperita* aliejus tepamas ant smilkinių ir kaktos buvo toks pat veiksmingas kaip 1g geriamojo acetaminofeno malšinant galvos skausmą, o jų derinys buvo žymiai stipresnis nei bet kuris gydymas atskirai [161]. Iš atlikto tyrimo su nikotinamidu ir streptozotocinu sukeltoms diabetinėms žiurkėms, kurioms buvo skiriama 40 ir 80 mg/kg kūno masės vaistinės pipirmėtės eterinio aliejaus ir gautų rezultatų daroma išvada, kad pipirmėčių eterinis aliejus pasižymi antidiabetiniu poveikiu. Tai patvirtino sumažėjęs gliukozės kiekis kraujyje, padidėjęs C-peptido, insulino kiekis, pagerėjusi β ląstelių struktūra bei hematologiniai, diabetinių žiurkių, parametrai. Manoma, kad šis efektas gali būti siejamas su eterinio aliejaus antioksidaciniu aktyvumu, kuris, kaip buvo pastebėta, šalina laisvuosius radikalus, kartu padidina antioksidacinių fermentų kiekį [162]. Be to, pipirmėčių eterinis aliejus yra perspektyvus kandidatas naudoti odos priežiūros priemonėse, turinčiose priešuždegiminių ir žaizdas gydančių savybių. Histologinio stebėjimo metu buvo patvirtinta, kad *Mentha piperita* slopina odos uždegiminį atsaką, o vietinis pipirmėčių kremo vartojimas parodė žymiai sumažėjusį negydytos žaizdos ploto greitį tarp 6-osios ($1,67 \pm 0,14 \text{ mm}^2$) ir 9-osios ($0,49 \pm 0,22 \text{ mm}^2$) gydymo dienos, palyginti su nešikliu ($2,32 \pm 0,77 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$) ir „Madecassol“ 0,1% kremu ($2,23 \pm 0,35 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$) [163]. Tyrimų duomenys įrodė *Mentha piperita* prieštumoringą poveikį. Ji slopina daugelio navikinių ląstelių dauginimąsi veikdama mitochondrijų disfunkcijas, apoptozės indukciją ir autofagijos procesus [164]. Pooperaciniam vėmimui bei pykinimui, taip pat rekomenduojama naudoti *M. piperita* eterinio aliejaus inhaliacijas, kaip veiksmingą ir prieinamą priemonę. Po atliktos vainikinių arterijų šuntavimo operacijos, iš viso 85,7% pacientų buvo nustatyti reikšmingi skirtumai pagal kontrolinės ir intervencinės grupės pykinimo dažnį, sunkumą ir trukmę bei vėmimo epizodų dažnį per pirmas keturias valandas po operacijos. Pipirmėtėje yra spazmolitinio mentolio, kuris mažina stemplės sfinkterio tonusą, palengvina raugėjimą bei tulžies nutekėjimą dėl kurio galiausiai sumažėja vėmimas, pykinimas [165]. Atsižvelgiant į lipofilinį pipirmėčių aliejaus pobūdį, leidžiantį jam prasiskverbti per odą, įrodyta, kad šis gali būti tinkamas agentas vietiniam gydymui sergant pasikartojančia herpeso infekcija. Virusų suspensijos tyrimuose *M. piperita* aliejus atitinkamai parodė 82% ir 92% virucidinį aktyvumą prieš pirmo ir antro tipo herpes virusą [166].

1.8. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Vaistinis šalavijas (lot. *Salvia officinalis* L.) ir pipirmėtė (lot. *Mentha piperita* L.) yra du svarbūs notrelinių šeimos augalai, turintys didelę komercinę, maistinę bei gydomąją vertę. Augaluose gausu natūralių fitocheminių junginių, sintetinamų pirminiais ir antriniais metabolizmo keliais bei lemiančių apibrėžtą jų terapinį aktyvumą. Šios bioaktyvios medžiagos, skirtingais kiekiais, kaupiamos visose augalų dalyse. Be to, kokybinius bei kiekybinius vaistinių augalų sudedamųjų komponentų pokyčius lemia biotinis, abiotinis stresas ir genetiniai veiksniai. Šalavijoje ir pipirmėte esančios aktyvios medžiagos (flavonoidai, fenoliai junginiai, terpenai) veikia priešūždegimiškai, pasižymi dideliu antidiabetiniu, priešvėžiniu, antioksidaciniu bei antimikrobiniu potencialu. Per pastaruosius tris dešimtmečius išaugus susidomėjimui vaistiniais augalais dėl jų naudos, saugumo sveikatai, padažnėjo šių antrinių metabolitų tyrimai. Bioaktyvių junginių gamyba *in vitro* tapo pagrindiniu, tvariu būdu pasiekti vis didėjančia rinkos paklausą. *In vitro* kultūras organiniais junginiais, hormonais, mineralais, augimo reguliatoriais ir kitomis reikalingomis medžiagomis aprūpina mitybinės terpės, todėl optimalaus hormonų ir organinių medžiagų balanso sukūrimas paspartina reikiamų fitocheminių junginių biosintezę vaistinių augalų kaliaus kultūrose.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Reagentai

NH₄NO₃; KNO₃; CaCl₂·2H₂O; MgSO₄·7H₂O; KH₂PO₄; KJ, H₃BO₃; MnSO₄·4 H₂O; ZnSO₄·7H₂O; Na₂MoO₄·2H₂O; CuSO₄·5H₂O; CoCl₂·6H₂O; FeSO₄·7H₂O; Na₂EDTA·2H₂O; mioinozitolis; nikotininė rūgštis; piridoksinas-HCl; tiaminas-HCl; glicinas; sacharozė; Agar-agaras; 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis, 3-indolilacto rūgštis; 1-naftilacto rūgštis; 6-benzilaminopurinas; NaClO (10 %); etanolis (70 %); sterilus vanduo; distiliuotas vanduo; metanolis; natrio fosfatinis buferis 0,2 M (pH 6,6); 1 % K₃[Fe(CN)₆]; trichloracto rūgštis (10 %); FeCl₃ (0,1 %); 300 mM acetato buferis (pH 3,6); 10 mmol 2,4,6-tripiridil-s-triazinas (TPTZ) ištirpintas 40 mmol/l HCl; FeCl₃ x 6H₂O (20 mmol/l); 2000 μmol/L FeSO₄ x 7 H₂O; DPPH etaloninio tirpalas; 20 mM fosfatinis buferis (pH7,4); 2 mM ABTS; 0,17 mM kalio persulfatas; 20 mM fosfatinis buferis (pH 7,4); acetonas (70 %); Folino-Kiokalto reagentas; natrio karbonato tirpalas (7,5 %); tanino rūgštis; albuminas; Bradfordo reagentas; 0,1 M Glicinas – HCl (pH 2,6); 0,1 M Natrio acetatas (pH 4,0); ledinė acto rūgštis; ninhidrininis reagentas; H₃PO₄; L-prolinas; C₂H₅OH (96%); CaCO₃; kvercetas; 2 % aliuminio chloridas; 0,066 M K/Na fosfatinis buferis (pH=7,4); 1 mM ditionitolis (DTT); 0,5 mM fenilmetilsufonilfluoridas; DMSO; polivinilpirolidonas; 40 mM Tris-HCl buferis; 10 mM L-metioninas; 54 μM nitromėlynasis tetrazolis; Tritonas X- 100 (0,025%); 3 μM riboflavinai; natrio chloridas; askorbo rūgštis; butilintas hidroksitoluenas.

2.2. Darbo priemonės ir aparatūra

- horizontalaus srauto laminaras;
- pH-metras;
- autoklavas;
- keičiamo tūrio automatinės pipetės;
- analitinės svarstyklės;
- termostatas;
- spektrofotometras;
- centrifuga;
- *Ependorf* centrifuga;
- termostatuojamas kratytuvas;
- laboratorinė grūstuvė su piestele;
- laboratorinė liepsna;
- mėgintuvėliai;
- *Petri* lėkštelės;
- skalpeliai;
- pincetai;
- matavimo kolbos
- filtravimo popierius.

2.3. *S. officinalis* ir *M. piperita* sėklų sterilinimas

Siekiant nuo sėklų paviršiaus pašalinti galimus virusus, grybelius bei bakterinius patogenus vaistinio šalavijo sėklos 1 min sterilinamos 70% C₂H₅OH ir 10 min – 0,01% HgCl₂ tirpalu, o po šio proceso praplaunamos 3 kartus steriliu distiliuotu vandeniu. Pipirmėtės sėklos atitinkamai 1 min laikomos 70% C₂H₅OH, 10 min – AgNO₃ tirpale ir 4 kartus praplaunamos steriliu distiliuotu vandeniu.

Aseptinėmis sąlygomis, laminare, sėklos sodinamos į mėgintuvėlius ir *Petri* lėkšteles. Laminaras sterilinamas 70% C₂H₅OH ir ultravioletiniais spinduliais.

2.4. Vaistinių augalų ląstelių mitybinės terpės paruošimas

Šalavijo ir pipirmėtės ląstelių kultivavimui privaloma mitybinė terpė bei išoriniai aplinkos veiksniai, tokie kaip temperatūra, šviesa. Augalų ląstelių kultivavimui *in vitro* įprasta maitinamoji terpė sudaroma naudojant mikroelementus, makroelementus, anglies šaltinį, augimo hormonus, organinius priedus. Viena dažniausiai naudojamų terpių audinių kultūroms kultivuoti yra Murashige & Skoog terpė, pasižyminti didele amonio druskų, nitratų ir kalio koncentracija, o į šios sudėtį įeina nikotininė rūgštis, ti amino hidrochloridas, mioinozitolis, piridoksino hidrochloridas (žr.2.1 lentelė.).

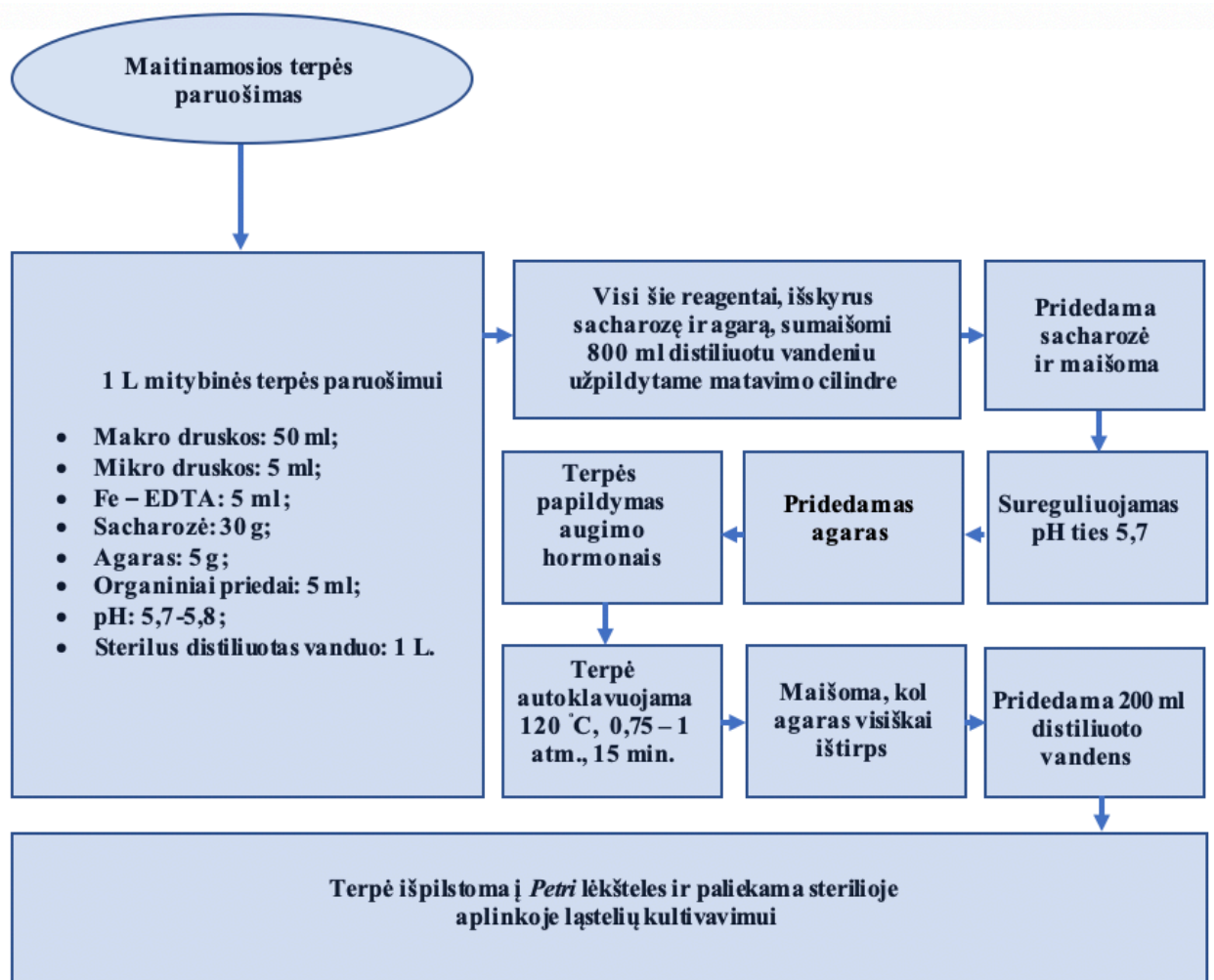
2.1 lentelė. Mitybinės Murashige & Skoog terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale mg/l	Koncentracija terpėje mg/l
Makroelementai ^b		
NH ₄ NO ₃	33000	1650
KNO ₃	38000	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	8800	440
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	7400	370
KH ₂ PO ₄	3400	170
Mikroelementai ^c		
KI	166	0,83
H ₃ BO ₃	1240	6,2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4460	22,3
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1720	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	50	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5	0,025
Geležies šaltinis ^c		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5560	27,8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	7460	37,3
Organiniai priedai ^c		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas-HCl	100	0,5
Tiaminas-HCl	100	0,5
Glicinas	400	2
Sacharozė		30000
Agar-agaras		5

b - 50 ml tirpalo pilame į terpę;

c – 5 ml tirpalo i terpę;

Eksperimento metu MS terpės reagentų kiekiai (žr.2.1 pav.) paimti iš pradinių tirpalų bei maišyti su 800 ml distiliuoto vandens, pridėdant sacharozę ir sureguliuojant pH 5,7. Terpės ruošimas tęstas pridėdant agarą, naudojamų augimo hormonų, 200 ml sterilaus distiliuoto vandens ir viskas maišyta, kol agaras pilnai ištirpsta. Terpė autoklavuota 120 °C temperatūroje, esant 0,75–1 atm. slėgiui, 15 min ir išpilstyta į sužymėtas *Petri* lėkšteles taip, kad užpildytų trečdalį indelių. Siekiant išvengti patogenų, mikrobu, grybelių trukdymo ląstelių dauginimuisi ir būtų padidinta sėkmingos *in vitro* kultūros tikimybė, maistinės terpės paliktos sterilioje aplinkoje. Optimali kultivavimo temperatūra yra 20–22 °C. Reguliariai kas 2 savaites kultivuojami eksplantai perkelti į naują mitybinę terpę.



2.1 pav. Maitinamosios terpės paruošimo schema

2.5. Augimo hormonų paruošimas

Tyrimo metu, skirtingomis koncentracijomis, naudoti 3 auksinai: 1-naftilacto rūgštis (NAR), 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D), 3-indolilacto rūgštis (IAR) ir 2 citokinai: 6-benzilaminopurinas (BAP), 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urėja (TDZ). Pagrindinės tiriamosios medžiagos tirpalo (0,1 mg/ml) paruošimui, į matavimo kolbą, pasverta ir suberta 10 mg tiriamojo junginio bei įpilta 2–5 ml distiliuoto vandens. Tiriamajam junginiui pilnai ištirpus, papildomai įpiltas dvigubas kiekis distiliuoto vandens ir viskas išmaišyta. Paruošimo pabaigoje, distiliuoto vandens pripilta iki 100 ml. Pagal formulę (1) apskaičiuojamas reikalingas paimti tiriamųjų medžiagų tirpalo tūris iš pradinio tirpalo:

$$X = \frac{A \times B}{C} \quad (1)$$

X – reikalingas paimti tirpalo tūris iš pradinio paruošto tirpalo su tiriamąja medžiaga, ml;

A – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;

B – praskiedimo tūris, l;

C – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamąja medžiaga, koncentracija (mg/ml).

Šis tūris praskiedžiamas iki 100 ml, kad gauti reikiama koncentracija (mg/l).

$$\frac{\text{norima fitohormono koncentracija, mg/l}}{\text{turima fitohormono koncentracija, mg/ml}} \times \text{terpės tūris, l} = \frac{\text{reikalingas fitohormono kiekis, ml}}{\text{fitohormono kiekis, ml}}$$

2.6. Augalinių žaliavų paruošimas tyrimams

Užaugintas vaistinis šalavijas ir pipirmėtė buvo džiovinti kambario temperatūroje, 48 val, kad būtų sumažintas oksidacinis nuostolis, prieš medžiagą susmulkinant. Vaistiniai augalai sutrinti 100 ml porcelianinėje grūstuvėje su piestele iki smulkių miltelių ir naudoti kiekybiniams, bioaktyvumo tyrimams.

2.7. Antioksidaciniai tyrimai

2.7.1. Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

Vaistinės pipirmėtės ir šalavijo antioksidacinės savybės buvo patikrintos DPPH• tyrimu. Šio tyrimo metu fenoliniai junginiai pasižymintys antioksidaciniu aktyvumu reaguoja su laisvuju radikalu DPPH•, o ši inaktyvavus atsiranda molekulės spalvos pasikeitimas, kuris išmatuojamas spektrofotometriškai 515 nm bangos ilgyje. Į mėgintuvėlius buvo įdėta 0,2 g susmulkinta ir išdžiovinta augalinė žaliava, užpilta 2 ml metanolio ir 10 min homogenizuota, o po to 10 min centrifuguota 9000 aps/min greičiu. 100 ml talpos matavimo kolboje tirpinant 0,0024 g DPPH radikalo metanolyje buvo paruoštas etaloninis DPPH tirpalas. 0,077 ml paruošto ekstrakto mėgintuvėliuose sumaišytas su 3 ml DPPH etaloniniu radikalų tirpalu. Analogiškai paruoštas kontrolinis mėginys, kuriame vietoj augalinio ekstrakto buvo identiškas kiekis metanolio. Gauti mišiniai palikti kambario temperatūroje, tamsoje 15 min. Mėginių absorbcija išmatuota 515 nm bangos ilgyje, o DPPH radikalų inaktyvinimo procentas buvo apskaičiuotas pagal lygtį (2):

$$\% \text{ slopinimas} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100 \quad (2)$$

A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

2.7.2. *S. officinalis* ir *M. piperita* antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną (TPTZ)

Tiriamųjų augalų ekstraktų gebėjimas redukuoti bespalvį Fe^{3+} - TPTZ kompleksą iki mėlynos spalvos Fe^{2+} - TPTZ, esant rūgštiniam pH atliktas naudojant redukuojančios geležies antioksidacinį tyrimą. Ekstraktas ruoštas 0,1 g išdžiovinta augaline žaliava 30 min ekstrahuojant 5 ml metanolyje 45°C temperatūroje ir mišinį centrifuguojant. Į praskiestus ekstraktų mėginius (80 µL metanolio ir 20 µL mėginio) buvo įdėta 3 ml FRAP. Šis reagentas buvo paruoštas sumaišius 2,5 ml 10 mmol TPTZ, 25 ml 300 mM acetato buferio ir 2,5 ml $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/l). Spektrofotometriškai matuota tiriamojo komplekso absorbcija 593 nm bangos ilgyje. Rezultatai buvo apskaičiuoti naudojant µmol/L Fe(II) /L kalibracinę kreivę. Ši parengta naudojant $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (5, 10, 15, 20; 25 µmol/L). Tuščias mėginys kalibracinei kreivei – 3 ml FRAP, 7 ml H_2O .

2.7.3. Šalavijo ir pipirmėtės redukcinių savybių nustatymas

Tyrimams reikalingo ekstrakto paruošimas vykdytas naudojant išdžiovinta ir susmulkinta 0,1 g augalinę žaliavą ekstrahuojant 5 ml metanolyje 30 min 45°C temperatūroje. Bandiniai centrifuguoti 10 min. Antioksidacinių savybių nustatymui, į paimtus 0,5 ml skirtingų koncentracijų ekstraktų bandinius įpilta 1,25 ml 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ ir 1,25 ml 0,2 M fosfatinis buferis. Išmaišyti mėginiai inkubuoti 20 min 50 °C temperatūroje. Tada įpilta 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties, o gautas mišinys centrifuguotas 5 min. Centrifuguoto tirpalo (1,25 ml) sumaišyta su 25 ml 0,1 % $FeCl_3$ ir 1,25 ml distiliuotu vandeniu. Mėginių šviesos sugertis išmatuota spektrofotometru 700 nm bangos ilgyje. Kaip tuščias mėginys naudotas – 1,0 ml 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ ir 1 ml 0,2 M fosfatinis buferis. Tiriamų mėginių redukcinių aktyvumą tiesiogiai atspindi šviesos absorbcija, kuo ši didesnė, tuo didesnės tiriamojo junginio redukcines savybės.

2.7.4. Pipirmėtės ir šalavijo antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu

ABTS tyrimas remiasi santykinu antioksidantų gebėjimu slopinti vandeninėje fazėje susidariusį radikalo anijoną. ABTS susidaro reaguojant su stipriu oksidatoriumi, pavyzdžiui, mūsų tyrime naudotu kalio persulfatu. Mėlynai - žalio ABTS radikalo sumažinimas antioksidantais, matuojamas pagal jam būdingo ilgųjų bangų sugerties spektro slopinimą. Tiriamasis vaistinių augalų ekstraktas paruoštas 0,1 g augalinę žaliavą ekstrahuojant 5 ml metanolyje 30 min 45 °C temperatūroje, o gautą mišinį 10 min centrifuguojant 9000 aps./min. Po to, 0,5 ml ekstrakto kiekis sumaišytas su 0,3 ml praskiestu ABTS tirpalu ir 1,7 ml fosfato buferiu (20 mM). Kontrolinis bandinys naudotas 20 mM fosfato buferis. ABTS radikalo šviesos sugertis fiksuota 734 nm bangos ilgyje ir procentinis radikalo anijono slopinimas nustatymas pagal formulę (2).

2.8. Augalų bioaktyvių metabolitų nustatymas

2.8.1. Bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu

Šio metodo principas yra Folino-Kiokalto reagento redukcija esant fenoliams, todėl susidaro molibdeno-volframo mėlyna spalva, kuri spektrofotometriškai matuojama 725 nm bangos ilgyje, o intensyvumas didėja tiesiškai didėjant fenolinių junginių koncentracijai reakcijos terpėje. Ekstrakto paruošimui pasverta 0,05g augalinė medžiaga suberta į 10 ml 70 % acetono tirpalą ir maišyta 20 min ant purtyklės, kambario temperatūroje. Tęsiant bandinio parengimą, jis centrifuguotas 10 min 9000 aps/min 4° C ir 2 min *Eppendorf* mėgintuvėliuose. 30 μl ekstrakto supernatanto praskiesta distiliuotu vandeniu iki 500 μl ir sumaišyta su Folino-Kiokalto reagentu, 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalu. Augalinį ekstraktą keičiant standartiniu tanino rūgšties tirpalu, tačiau skirtingais kiekiais - 0,0; 20; 40; 60; 80; 100, 120 μl, analogiškai paruošti mėginiai kalibravimo kreivėi sudaryti. Išmaišytų mėginio absorbcija, po 40 min inkubacijos tamsoje, matuota spektrofotometru 725 nm bangos ilgyje. Bendra fenolinių junginių koncentracija pagal tanino rūgšties ekvivalentą (mg/100 g) apskaičiuota pagal formulę (3):

$$x = aV \times 100/n \quad (3)$$

a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris l;

n – augalinė masė, g

2.8.2. Flavonoidų koncentracijos nustatymas pipirmėtėje ir šalavijuje

Plačiai taikomas kiekybinio flavonoidų nustatymo metodas yra pagrįstas jo reagavimu su aliuminio chloridu ir susidariusio komplekso spektrofotometriniu nustatymu, kuris suteikia hiperchrominį efektą ir bathochrominį poveikį. Analizei atlikti augalinė medžiaga (0,5g) buvo ekstrahuota 5 ml 80 % metanoliu parą laiko termostatuojamame kratytuve 150 rpm greičiu. Po 10 min homogenato centrifugavimo 9000 rpm, surinktas supernantas naudotas eksperimente. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas po 30 min tiriamojo bandinio (0,1 ml) veikimo 1 ml 80 % metanoliu ir 1 ml 2 % aliuminio chloridu atliktas išmatuojant šio mišinio absorbciją 415 nm bangos ilgiuje, spektrofotometru. Vaiztažolių žaliavos rezultatai apskaičiuoti pagal kvercetiną mg/g, naudojant lygtį (4):

$$c = \frac{C_1 \times V}{g} \quad (4)$$

C_1 – kvercetino koncentracija mg/ml pagal kalibracinę kreivę;

V – ekstrakto pradinis tūris, ml

g – augalinė masė, g

Kalibracinė kreivė paruošta 1 mg/ml kvercetino ištirpinant metanolyje. 10 mg/l; 20 mg/l; 30 mg/l; 40 mg/l; 50 mg/l tirpalo koncentracijos išgautos į 5 mėgintuvėlius įpilant atitinkamą kiekį kvercetino tirpalo (0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml) ir 0,15 ml 2 % aliuminio chlorido. Kiekvienas bandinys praskiestas metanoliu iki 10 ml, šviesos sugertis išmatuota 415 nm bangos ilgiuje. Kaip kontrolė naudotas metanolis.

2.8.3. Fenolinių rūgščių nustatymas pipirmėtėje ir šalavijuje

Vandeninis augalinės žaliavos ekstraktas buvo gautas 30 min homogenizuojant 0,1 g augalinės medžiagos su 2 ml distiliuotu vandeniu termostatuojamame kratytuve 25 °C. Ekstraktas 10 min centrifuguotas ir praskietas distiliuotu vandeniu iki 5 ml. Į 1 ml turimo ekstrakto įpilta 5 ml distiliuoto vandens, 1 ml Arnovo reagento, 1 ml HCl ir 1 ml NaOH. Tirpalas iki 10 ml praskiestas distiliuotu vandeniu. Spektrofotometrinis matavimas 490 nm bangos ilgiuje atliktas, siekiant nustatyti šviesos sugertį ir pagal formulę (5) apskaičiuota fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį %:

$$\% = \frac{A \times 1.7544}{m} \quad (5)$$

A – šviesos sugerties reikšmė

m – augalinė masė, g

1,7544 – koeficientas (pagal kavos rūgštį)

2.8.4. Pipirmėtės ir šalavijo pigmentų koncentracijos nustatymas

Chlorofilo a ir b bei karotinoidų tyrimas augalų audiniuose paremtas spektrofotometriniu šviesos absorbcijos nustatymu atitinkamuose bangos ilgiuose (chlorofilo a – 662 nm, chlorofilo b – 644 nm, karotinoidų – 441 nm). Junginių nustatymui smulkinti augaliniai mėginiai tiksliai pasverti iki 1 g, ištirpinti 20 ml 96% etanolyje ant kratytuvo ir filtruoti į cilindrą. Gauti ekstraktai praskiesti etanoliu, tiek, kad būtų gaunamos 0,1–0,8 šviesos absorbcijos reikšmės. Filtrato absorbcija spektrofotometru išmatuota bangos ilgiuose chlorofilo a – 662 nm, chlorofilo b – 644 nm ir karotinoidų – 441 nm.

Pigmentų koncentracija nustatoma pagal formules (6),(7),(8), (9), (10):

$$\text{Chlorofilo } a \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_a = 9,784 D_{662} - 0,99D_{644}; \quad (6)$$

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_b = 21,426D_{644} - 4,65D_{662}; \quad (7)$$

$$C_a + C_b = 5,134D_{662} + 20,436D_{644}; \quad (8)$$

$$\text{Karotinoidų koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_{\text{karotinoidai}} = 4,695D_{441} - 0,268 (C_a + C_b); \quad (9)$$

Pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuojamas:

$$X = CVV_2 \times 100 / nV_1 \times 1000 \quad (10)$$

C – pigmentų koncentracija mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

V₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml ;

n – augalinė masė, g .

2.8.5. Liuteino koncentracija *S. officinalis* ir *M. piperita* augaluose

Siekiant nustatyti junginio koncentraciją tiriamojoje medžiagoje, šviežiai sumaltas mėginys (100 mg) ekstrahuotas 20 ml acetonu ir maišytas kratytuve 250 rpm greičiu 240 min. Gautai suspensijai leista stovėti 5 min, o po to ji centrifuguota 9000 aps/min greičiu, 10 min. Į išsiskyrusias nuosėdas pridėta 10 ml acetono ir 60 min švelniai maišyta bei 15 min centrifuguota 9000 aps/min greičiu. Liuteino koncentracija vaistiniuose augaluose nustatytas iš formulės (11), prieš tai išmatavus mėginių šviesos sugertį 446 nm bangos ilgyje pagal acetoną.

$$X = \frac{A_{446}}{(14,45 \times 10^4)} \times \left(\frac{1}{b}\right) \times 568,88 \times \frac{V}{M} \times \frac{1L}{10^3 ml} \times 10^3 \frac{mg}{g} \times \frac{kg}{10^3 g} \quad (11)$$

X – mg/g liuteino koncentracija;

A₄₄₆ – mėginio šviesos absorbcija;

b – bangos ilgis (1 cm);

V – ekstrakto tūris, ml;

M – augalinė žaliava, kg;

14,45 × 10⁴ – molinės ekstincijos koeficientas (Lmol⁻¹cm⁻¹).

2.8.6. Šalavijo ir pipirmėtės bendrosios antocianinų koncentracijos nustatymas

Antocianinai iš augalinės žaliavos (0,2g) buvo ekstrahuoti etanolio (5ml) ir 15 min homogenizuoti 25 °C. Homogenatai 10 min centrifuguoti 9000 aps/min greičiu. Tada į vaistinių augalų ekstraktų mėginius (1ml) atskirai įpilti 980μl NaOAc (pH 4,5) ir 980μl KCl (pH 1) buferiai. Abiejų tirpalų absorbcija išmatuota spektrofotometru 510 nm ir 700 nm bangos ilgiuose. Kontrolinis mėginys naudotas 50% etanolis. Bendroji antocianinų koncentracija nustatyta iš formulės (12):

$$\text{BAK} = (A \cdot M \cdot \text{PF}) \cdot \frac{1000}{\varepsilon} \quad (12)$$

BAK – bendroji antocianinų koncentracija miligramai cianidin-3-gliukozido ekvivalento 100g;

A – absorbcija = $(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4,5}}$;

M – molekulinė masė (449,2 g/mol);

PF – praskiedimo faktorius;

ϵ – cianidin-3-gliukozido (C-3-GE) molinis absorbcijos koeficientas (26900 l/mol cm).

2.8.7. Askorbo rūgšties kiekybinis nustatymas

Šio metodo principas yra titravimas 2,6-dichlorofenolindofenolio natrio druskos hidratu. Askorbo rūgštis reaguoja su hidratu pakeisdama spalvą iš mėlynos į bespalvę. Tyrimui naudota susmulkinta, džiovinta medžiaga užpilta 10 ml druskos rūgšties tirpalu, išmaišyta ir papildomai įpilta dar 40 ml rūgšties. Mišinys (10 ml) filtruotas ir toliau naudotas titravimui su 2,6-dichlorofenolindofenolio natrio druskos hidratu, 50 ml tūrio kosinusinėje kolboje, kol bandinys nusidažo skaisčiai rausva spalva. Titravimo procesas kartotas tris kartus ir apskaičiuotas vidurkis. Askorbo rūgšties koncentracija 100 gramų, mg% nustatyta pagal proporcija:

$$\begin{array}{l} 1\text{g} - 1,76\text{ mg} \\ 100\text{g} - x\text{ mg} \end{array} \quad X=176\text{ mg\%}$$

2.8.8. Baltymų koncentracijos nustatymas *S. officinalis* ir *M. piperita* augaluose

Bradfordo metodas, pagrįstas susidariusio komplekso matavimu, sąveikaujant baltymams su Kumasi briliantiniu mėliu, taikant spektroskopinę analizę 595 nm bangos ilgyje. Iš sausos augalinės žaliavos (0,05 g) baltymai išekstrahuoti panaudojant atskirus buferius (0,1 M Glicinas – HCl; pH 2,6 ir 0,1 M Natrio acetatas (pH 4,0)), juos supylus į skirtingus mėgintuvėlius po 1ml. Po vienos valandos maišymo ir 20 min centrifūgavimo 4 °C temperatūroje, į gautą ekstraktą (200 µl) pridėta Bradfordo reagento (2 ml). Praėjus 2 min matuota bandinio šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje ir apskaičiuota bendra baltymų koncentracija X (mg/100 mg) pagal lygtį (13):

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n} \quad (13)$$

a – baltymo koncentracija iš kalibravimo kreivės, mg/ml;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, mg.

Kalibracinei kreivei reikalingas albumino tirpalas paruoštas 25 ml vandens ištirpinant 25 mg albumino. Šis tirpalas supilstytas į atskirus mėgintuvėlius 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6, 1,8 ml tūriais ir skiestas distiliuotu vandeniu iki 10 ml, po to pridėdant 2 ml Bradfordo reagento. Išmaišius mėginius, jų absorbcija esant 595 nm bangos ilgiui, išmatuota spektrofotometru.

2.8.9. L-Prolino nustatymas vaistiniuose augaluose

L-Prolino aminorūgšties nustatymas yra labai naudingas norint įvertinti augalų fiziologinę būklę ir suprasti jų atsparumą stresui. Didelio našumo laisvojo prolino koncentracijai nustatyti naudotas spektrofotometriniu metodu 520 nm bangos ilgyje. Ruošiant tiriamąjį augalinį ekstraktą, mėgintuvėlyje 100 mg susmulkintos augalinės medžiagos užpilta 4 ml distiliuotu vandeniu ir 3 min kaitinta 95 °C temperatūroje. Po to, mėgintuvėlis atšaldytas ir procesas papildomai kartotas tris kartus. Paruoštas ekstraktas centrifuguotas 9000 aps/min. greičiu 10 min. Surinktas supernantas, naujame mėgintuvėlyje, praskiestas iki 6 ml. Analizei paimta 1 ml ekstrakto sumaišyta su 1 ml ninhidridiniu

reagentu, 1 ml acto rūgštimi ir šildyta 60 min vandens vonelėje. Tuščias mėginys paruoštas analogiškai, 1 ml augalinio ekstrakto keičiant 1 ml distiliuoto vandens. 520 nm bangos ilgyje išmatuotas bandinio optinis tankis, o prolino koncentracija, esanti augaliniame ekstrakto, nustatyta naudojantis *L*-proline kalibravimo kreive pagal lygtį (14):

$$C_x = \frac{E \times k \times V_{\text{bendras}}}{V_{\text{paimta}} \times m} \quad (14)$$

C_x – *L*-proline koncentracija $\mu\text{mol/g}$;

E – tirpalo šviesos sugertis;

k – *L*-proline koncentracija, gautas pagal kalibravimo kreivę (μmol)

V_{bendras} – bendras ekstrakto tūris, ml;

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g.

L-Proline kalibravimo kreivei reikalingas aminorūgšties tirpalas paruoštas 10 ml distiliuoto vandens ištirpinant 0,0011 g *L*-proline. Į 8 mėgintuvėlius įpilti skirtingi kiekiai *L*-proline tirpalo (0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,175 mM), jie praskiesti iki 1 ml distiliuotu vandeniu ir papildomai įdėta 1 ml ninhidrininio reagento, 1 ml acto rūgšties. Kontroliniui mėginiui paruošti *L*-proline tirpalas keičiamas 1 ml distiliuotu vandeniu, papildomi reagentai ir jų kiekiai išliko tie patys. Visi bandiniai 60 min kaitinti 95 ° C temperatūroje vandens vonelėje. Jiems atvėsus šviesos absorbcija išmatuota 520 nm bangos ilgyje.

2.8.10. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas

Malondialdehidas kiekybiškai vertinamas kaip stiprus šviesą sugeriantis ir fluorescuojantis aduktas po reakcijos su tiobarbitūro rūgštimi išmatuojamas 532 ir 600 nm bangos ilgiuose. Augalinė medžiaga (100 mg) 10 min homogenizuota su 1,5 ml 20% trichloracto rūgštimi, toliau 10 min centrifuguota 9000 aps/min 4 °C ir 2 min *Eppendorf* mėgintuvėliuose. Supernantas (0,3 ml) sumaišytas su 1,3 ml 0,5% tiobarbitūrine rūgštimi. Mišinys 30 min inkubuotas 95 °C temperatūroje, atšaldytas ir 10 min centrifuguotas 9000 aps/min. MDA koncentracija nustatyta pagal formulę (15), o šviesos absorbcija fiksuota 532, 600 nm bangos ilgiuose.

$$C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \cdot V_e \cdot 2}{k \cdot m \cdot V_a} \quad (15)$$

C_x – MDA koncentracija $\mu\text{mol/g}$;

E – tirpalo šviesos sugertis;

V_e – ekstrakto tūris, ml;

V_a – ekstrakto tūris analizei, ml;

k – molekulinės ekstincijos koeficientas $156 \text{ Mm}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$;

m_s – bandinio masė, ekstrakcijai, g.

2.9. Antioksidaciniai fermentai

2.9.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas augaluose

Superoksido dismutazės aktyvumas nustatomas kaip chromogeno slopinimas arba mažinimas 560 nm bangos ilgyje. Vaistinis augalinis ekstraktas buvo paruoštas homogenizuojant smulkinta augalinę

žaliavą (0,1 g) 0,066 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH 7,4) 4 ml tūryje. Buferinė terpė turi ištirpinto DMSO, 1-3 mg polivinilpirolidono, 1 mM ditioneitolio, 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido. Tas pats augalo mėginys maišytas 10 min kratytuve 25 °C ir 10 min centrifuguotas 9000 aps/min. Supernantas surinktas ir dar centrifuguotas *Eppendorf* mėgintuvėliuose. 200 µl mėginio paimta baltymų nustatymui ir sumaišyta su 2 ml Bradfordo reagento. Spektrofotometru išmatuota šviesos sugertis 595 nm bangos ilgyje ir nubraižyta baltymų kalibravimo kreivė pagal albuminą. 2 ml reakcijos mišinyje buvo 640 µl distiliuoto vandens, 200 µl 100 mM L-metionino, 500 µl 0,1% Tritono X-100, 400 µl 200 mM Tris-HCl buferio (pH 7,8), 540 µM nitromėlynojo tetrazolio, 20 µl 300 µM riboflavino, ir 40 µl fermentinio preparato. Kontrolinė reakcija atlikta be fermentinio mišinio. Fermento superoksido dismutazės reakcija įvykdyta veikiant reakcijos mišinį liuminescencinėmis lempomis. Po 30 min inkubacijos užfiksuota mėginių šviesos absorbcija 560 nm bangos ilgyje ir apskaičiuotas fermento aktyvumas (16):

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{\log 2 \times m} \quad (16)$$

A – SOD aktyvumas vnt/mg;

E_K – šviesos sugertis kontrolinio bandinio;

E_T – šviesos sugertis tiriamojo bandinio;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml (Baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal Bradfordo metodą).

2.9.2. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas *S. officinalis* ir *M. piperita* augaluose

Prolindehidrogenazės aktyvumas nustatomas spektrofotometriškai, kambario temperatūroje, stebint šviesos sugerties didėjimą 340 nm bangos ilgyje. Ekstrakcijai atlikti 0,1 g medžiagos 10 min maišyta su 4ml buferiu (pH 7,8) į kurio sudėtį įeina 1 mM EDTA; 0,05 M Tris-HCl (pH 7,8), 0,5% Tritono X-100. 10 min ekstraktas centrifuguotas 9000 aps/min, o surinktas supernatantas 3 min *Eppendorf* mėgintuvėliuose. Baltymo fiksavimui reakcijos mišinys parengtas su 200 µl mėginio ir 2 ml Bradfordo reagento. Mišinio šviesos sugertis išmatuota 595 nm bangos ilgyje ir nubraižyta baltymų kalibracinė kreivė pagal albuminą. Mėginys paruoštas įpilant 1800 µl 0,02 M L-prolino, 1800 µl karbonatinio buferio, 400 µl fermentinio preparato ir prieš pat spektrofotometrinių matavimą 100 µl 100 M NAD. Šviesos absorbcija fiksuota pradžioje ir po 3 min 340 nm bangos ilgyje ir fermento aktyvumas nustatytas pagal formulę (17):

$$A = \frac{1000 \times \Delta E \times V}{k \times m} \quad (17)$$

A – prolindehidrogenazės aktyvumas µmol NAD/mg baltymo x min;

ΔE – šviesos sugerites pokytis po 3 min ir pradžioje;

V – bendras mišinio tūris, ml;

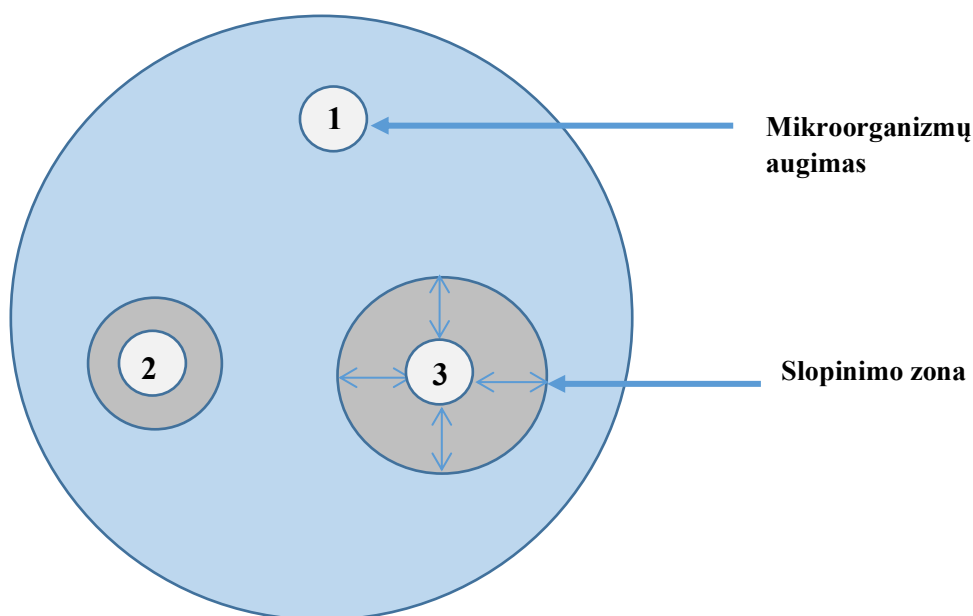
k – molinės ekstincijos koeficientas 6,22 µmol⁻¹x cm⁻¹;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg.

2.10. Antibakterinis aktyvumas

2.10.1. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinis įvertinimas prieš *Xanthomonas campestris*; *Rhizobium radiobacter* bakterijas

Antibakterinis aktyvumas ištirtas remiantis bakterijų suspensijų, *Xanthomonas campestris*; *Rhizobium radiobacter* auginimu *Petri* lėkštelėse, šias slopinant Ciprofloksacino antibiotiku bei vaistinių augalų ekstraktais. 0,5 g augalinės medžiagos ekstrahuota 5 ml DMSO tirpalu ir 10 min centrifuguota 9000 aps/min. Paruošta Luria-Bertani terpė (pH 7) į kurios sudėtį įeina 10,0 g/L triptono; 10,0 g/L natrio chlorido, 5,0 g/L mielių ekstrakto ir 10 g/L mikro agarų. Bandymui naudotas Ciprofloksacino antibiotikas (darbinė koncentracija - 50 µg/ml), jį ištirpinant 10 mg/ml DMSO tirpale. Steriliai laminare vykdytas bakterijų sėjimas į *Petri* lėkšteles pripildytas paruošta kietą mitybinę terpę, užpilant 50 µl *Rhizobium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* bakterijų suspensijomis. Lėkštelėse uždėti 6 popieriniai diskai, ant kurių užlašinta 25 µl augalinio ekstrakto. Kontroliniai mėginiai paruošti ant popierinių diskų užlašinant 25 µl antibiotiko. *Petri* lėkštelės 48 val. termostatuotos 37 °C temperatūroje ir fiksuotas antibakterinis augalinių ekstraktų ir Ciprofloksacino aktyvumas, matuojant susidariusias slopinimo zonas.



2.2 pav. Bakterijų slopinimas *Petri* lėkštelėse augaliniais ekstraktais

2.11. Statistinė analizė

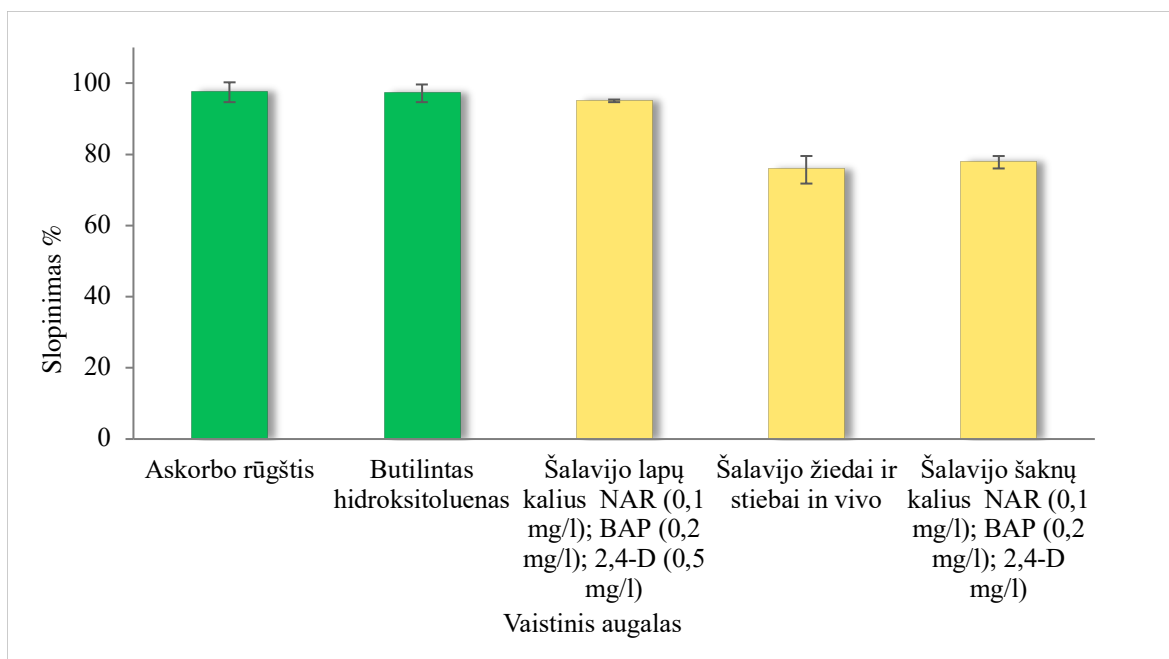
Visi vaistinių augalų ekstraktų fitocheminių medžiagų, antimikrobinio, antioksidacinio aktyvumo matavimai buvo atlikti trimis egzemplioriais, o bioaktyviųjų junginių kiekio ir antioksidacinio, antimikrobinio aktyvumo rezultatai pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Gauti tyrimų rezultatai buvo analizuojami „Microsoft Excel“ kompiuterinės programos pagalba, apskaičiuojant rezultatų vidurkius, junginių kiekius ir koncentracijas, braižant stulpelinio tipo grafikus bei kalibracines kreives.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumo įvertinimas

Šalavijo ir pipirmėtės ekstraktų antioksidacinis aktyvumas buvo įvertintas *in vitro* metodais, įskaitant gebėjimą slopinti ar neutralizuoti stabilius laisvuosius radikalus, tokius kaip ABTS• (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfonrūgštes) radikalą), DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilą), taip pat dėl gebėjimo redukuoti metalų jonus, atliktas redukcinių savybių nustatymas (RP) ir geležies redukcinio, antioksidacinio poveikio tyrimas (FRAP).

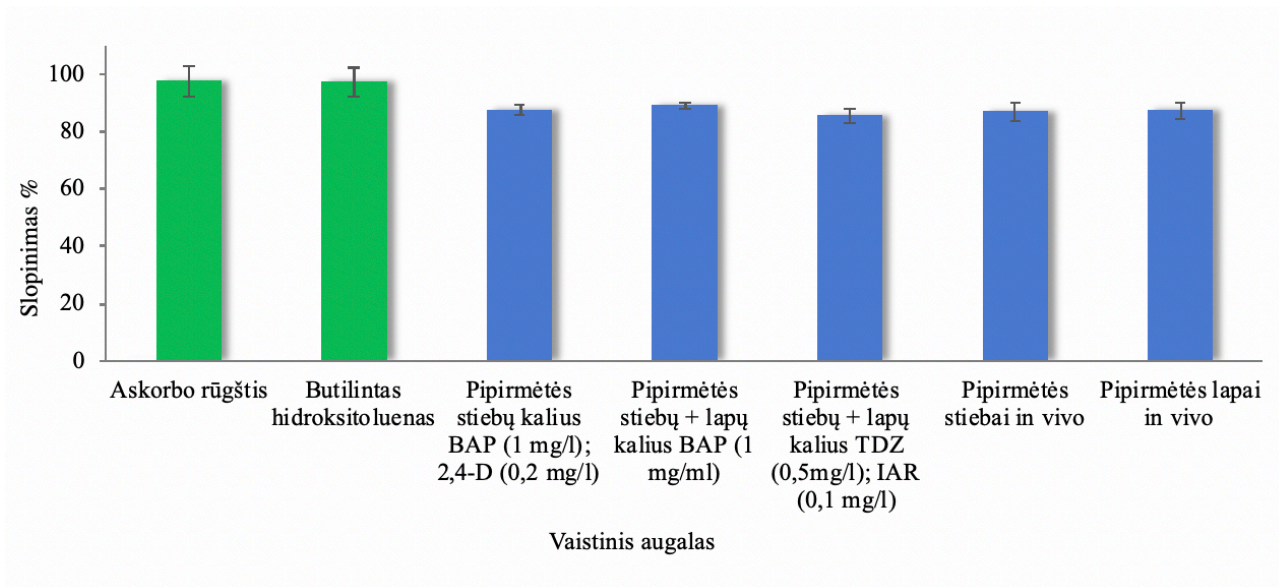
3.1.1. Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu



3.1 pav. *S. officinalis* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas naudojant DPPH metodą

Iš gautų duomenų pateiktų (žr. 3.1 pav) matome, kad fenoliniai junginiai esantys šalavijo skirtingo augalo dalyse, demonstruoja gana stiprų laisvųjų radikalų inaktyvinimą lyginant su antioksidantais – askorbo rūgštimi ar butilintu hidroksitoluenu. Stipriausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo šalavijo lapų kaliaus ekstraktas (95,00%), mažesniu – šalavijo šaknų kaliaus ekstraktas (77,76%). O, šalavijo žiedų ir stiebų mišinio *in vivo* ekstraktui buvo būdingas silpniausias antioksidacinis poveikis (75,64%).

Hassan ir kt. [167] atliktame DPPH tyrime nustatė efektyviausia vaistinio šalavijo ekstrakto *in vivo* koncentraciją kaip kontrolę naudojant sintetinį antioksidantą – butilintą hidroksianizolį. Šalavijo etanolio ir vandens ekstraktai parodė stiprią koreliaciją tarp jų koncentracijos ir antioksidacinio aktyvumo. Didžiausiu radikalų šalinimo aktyvumu pasižymėjo 200 µg/ml koncentracijos, etanolio ekstraktas (89,34±1,3%), lyginant su kitais ekstraktais. Mūsų atliktame tyrime šalavijo *in vivo* kaliaus ir stiebų ir žiedų mišinys bei šalavijo šaknų kaliaus pasižymėjo panašiu rezultatu (90,72%), tačiau *in vitro* lapų kultūra demonstravimo didesnę antioksidacinę aktyvumą (75,64–77,76%). Grzegorzcyk ir kt. [168] gavo priešingus rezultatus tiriant metanolio *S. officinalis* ekstraktus, nes *in vitro* pasižymėjo mažesniu DPPH inaktyvinimo efektyvumu (72,3±2,2) nei *in vivo* ekstraktas (81,4±0,8).

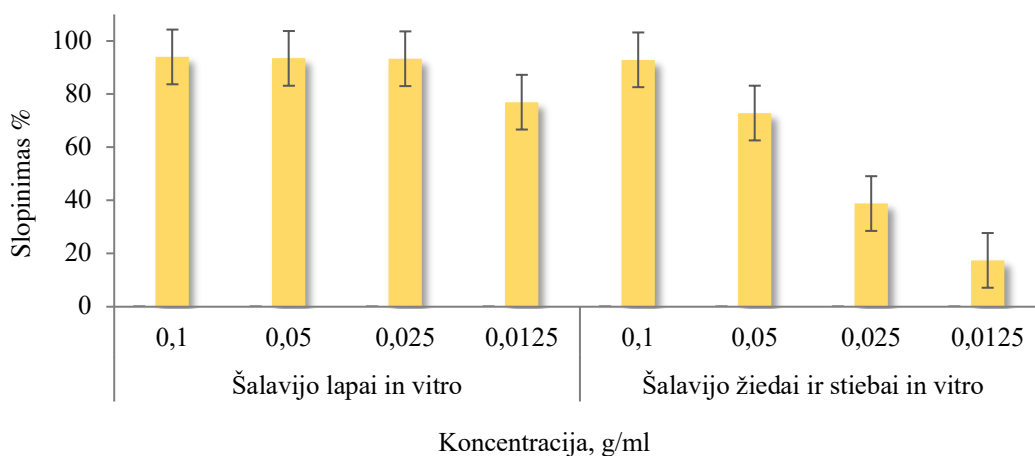


3.2 pav. *M. piperita* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas naudojant DPPH metodą

Po įvykusio elektronų perdavimo tyrimo, pastebėta (3.2 pav), kad pipirmėtės ekstraktuose esantys fenoliniai junginiai parodė stipresnį antioksidacinį aktyvumą nei šalavijų ekstrakto. Taip pat pipirmėtės lapų ir stiebų *in vitro* kultūros ekstraktai su BAP augimo reguliatoriumi (88,95%), stiebų (87,92%) ir stiebų bei lapų kaliaus kultūros su TDZ; IAR (85,33%) ekstraktai neutralizavo didesnę DPPH radikalo kiekį nei pipirmėtės stiebų ir lapų kultūros *in vivo* (atitinkamai 86,81% ir 87,12%).

M. piperita in vivo gauti rezultatai atitinka kitų mokslininkų tyrimus, kuriuose ištyrus antioksidacinę augalo veiklą DPPH metodu, veiksmingiausi buvo pipirmėčių lapų chloroformo ekstraktas ir pipirmėčių eterinis aliejus parodė ~90% antioksidacinį poveikį kaip ir mūsų tyrimo *in vivo* pipirmėčių lapų bei stiebų mėginiai. Mokslininkai tyrime patvirtino teigiamą koreliaciją su fenolinių junginių koncentracija ir augalo antioksidaciniu aktyvumu [169].

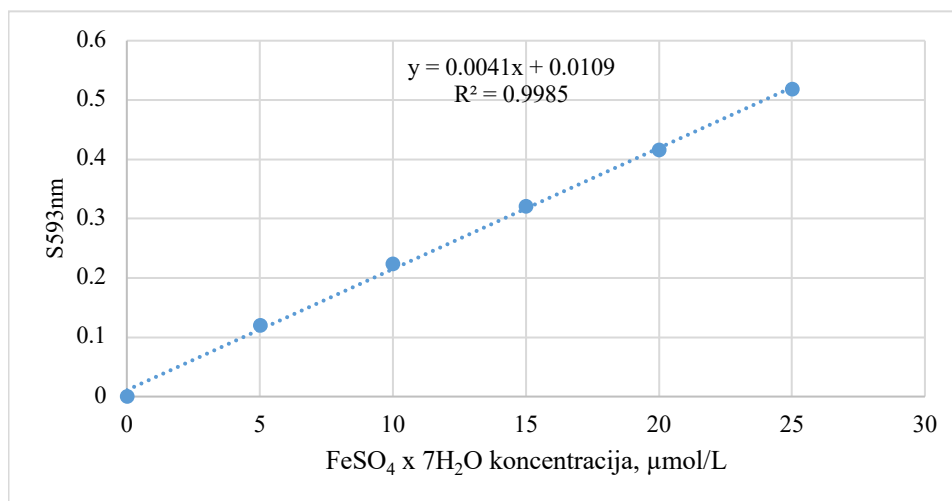
3.1.2. Vaistinio šalavijo ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu su skiedimu



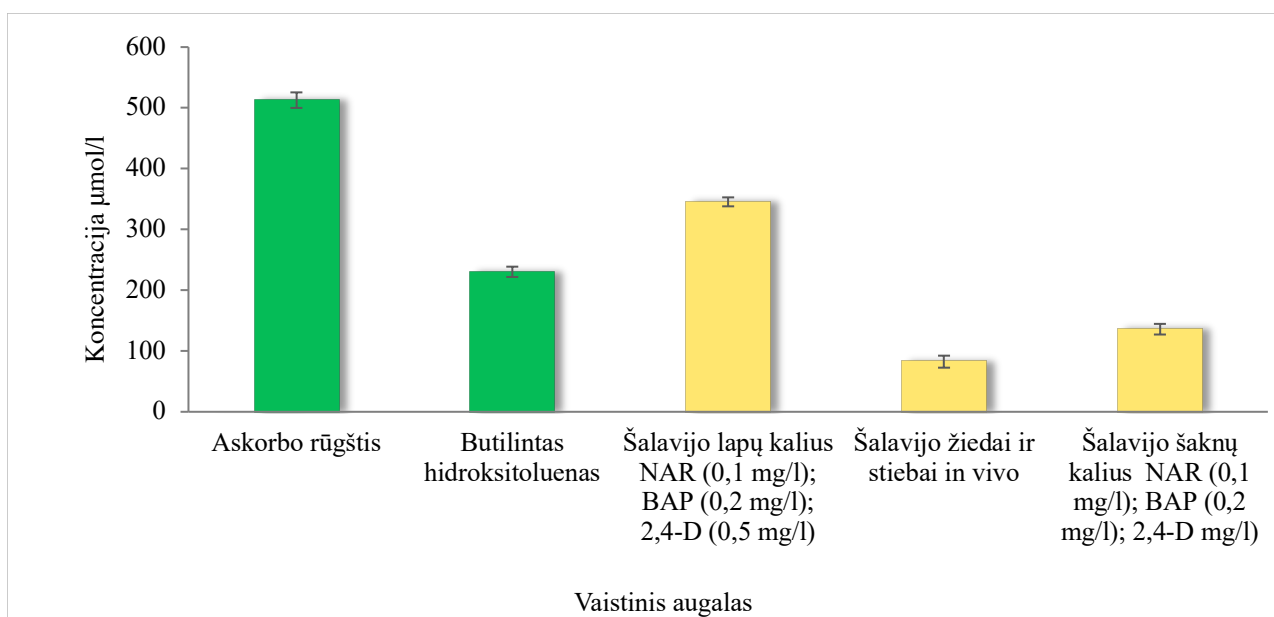
3.3 pav. *S. officinalis* su skirtingomis ekstraktų koncentracijomis antioksidacinis aktyvumas naudojant DPPH metodą

Iš atlikto DPPH metodo (žr. 3.3 pav.) su skirtingomis šalavijų *in vivo* ekstraktų koncentracijomis, matome akivaizdžiai didesnę antioksidacinę pajėgumą *S. officinalis* lapų ekstraktuose nei žiedų ir stiebų ekstraktuose visose koncentracijose. Taip pat pastebėta mažėjančio antioksidacinio aktyvumo tendencija, mažėjant ekstrakto koncentracijai. Taigi, didžiausia radikalo neutralizavimo geba nustatyta šalavijo lapų 0,1 g/ml ekstrakto (94,00%), panašiu aktyvumu pasižymėjo šalavijo ekstrakto aktyvumas siejamas su šalavijo žiedų ir stiebų 0,025 g/ml ir 0,0125 g/ml koncentracijomis (atitinkamai 38,82% ir 17,43%).

3.1.3. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-triplitidil-s-triaziną



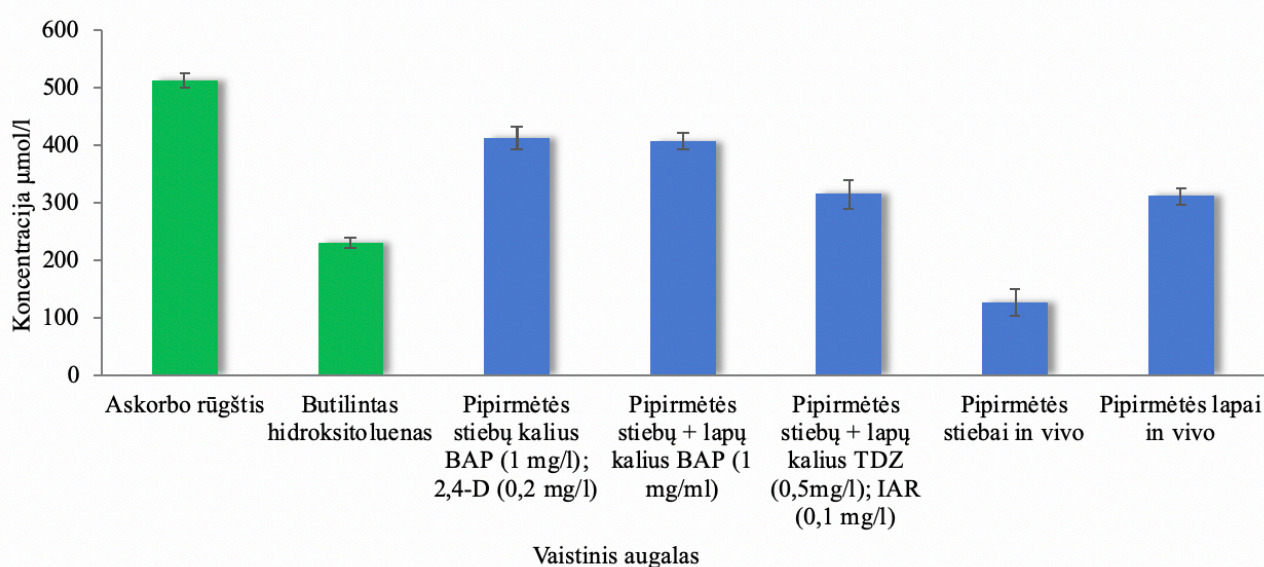
3.4 pav. Kalibracinė kreivė pagal FeSO₄ x 7H₂O



3.5 pav. *S. officinalis* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą

Nustačius šalavijo ir pipirmėtės redukuojančias savybes, pastebėta (žr. 3.5 pav.), kad intensyviausiu antioksidaciniu pajėgumu išsiskyrė šalavijo lapų *in vitro* ekstraktas (345,39 $\mu\text{mol/l}$), tačiau silpnesniu nei antioksidantas – askorbo rūgštis (512,71 $\mu\text{mol/l}$). Vidutiniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo šalavijo šaknų *in vitro* ekstraktas (135,88 $\mu\text{mol/l}$), o mažiausiu žiedų ir stiebų ekstraktas (82,46 $\mu\text{mol/l}$).

Didesnis veiksmingumas (123,2 \pm 1,02 $\mu\text{mol/l}$) pasiektas Hemmati ir kt. [170] darbe naudojant optimalią šalavijo lapų mėginį su 0,5 mg/l 2,4-D+ 0,5 BAP mg/l augimo regulatoriais. Artimos FRAP tyrimų reikšmės gautos kitų tyrėjų darbe lyginant šalavijo ir rozmarino lapų ekstraktus, skirtingose koncentracijose 20–150 $\mu\text{g/ml}$ *in vivo*. Stipresniu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo šalavijo lapų ekstraktas, kurio antioksidacinis aktyvumas tiesiogiai priklausė nuo ekstrakto koncentracijos ir svyravo 12,32–77,82 $\mu\text{mol/l}$ ribose. Mūsų tyrime šalavijų lapų ekstraktas *in vitro* pasižymėjo didesniu 87,09 $\mu\text{mol/l}$ aktyvumu, *in vivo* žiedų ir stiebų mėginys (11,24 $\mu\text{mol/l}$) panašus į mažiausią šalavijo lapų ekstrakto vertę [171].

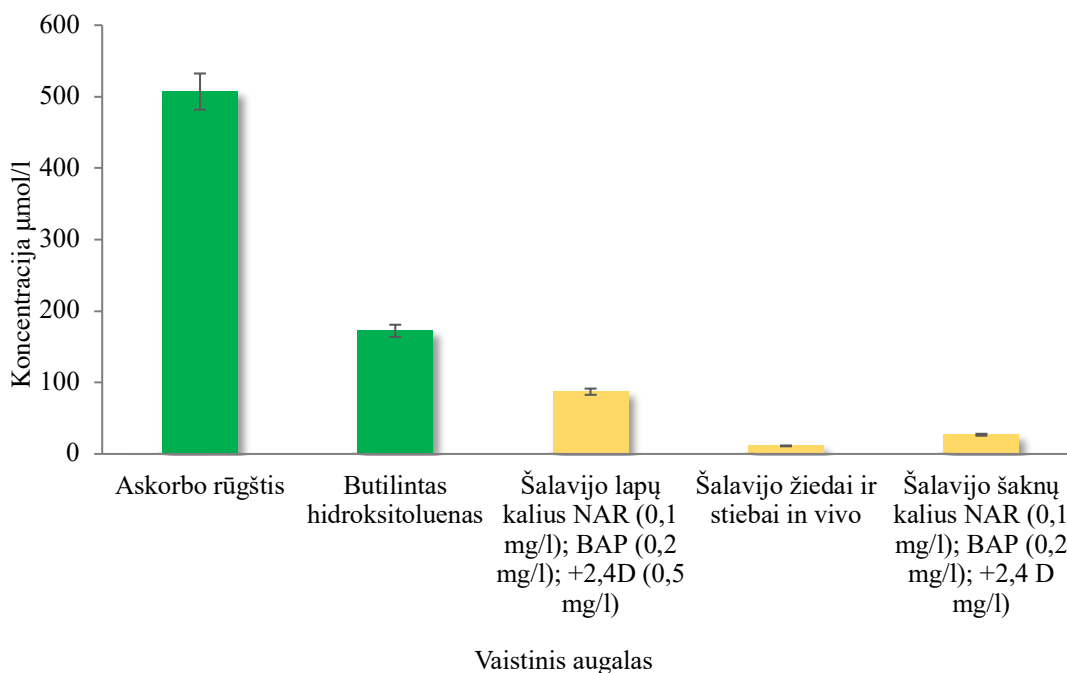


3.6 pav. *M. piperita* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą

Pagal gautus rezultatus (žr. 3.6 pav), pipirmėčių ekstraktas pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu pagal FRAP metodą nei šalavijų ekstraktas. Taip pat didesniu redukuojančiu poveikiu pasižymėjo *M. piperita* kaliaus kultūrų ekstraktas nei *in vivo* sąlygomis augintos žaliavos ekstraktas. Pipirmėtės stiebų kaliaus (411,49 $\mu\text{mol/l}$) ir stiebų ir lapų mišiniui su BAP augimo reguliatoriumi (406,61 $\mu\text{mol/l}$) ekstraktui nustatytos didžiausios koncentracijos. Mažiausia – pipirmėtės stiebų *in vivo* ekstrakto (126,37 $\mu\text{mol/l}$).

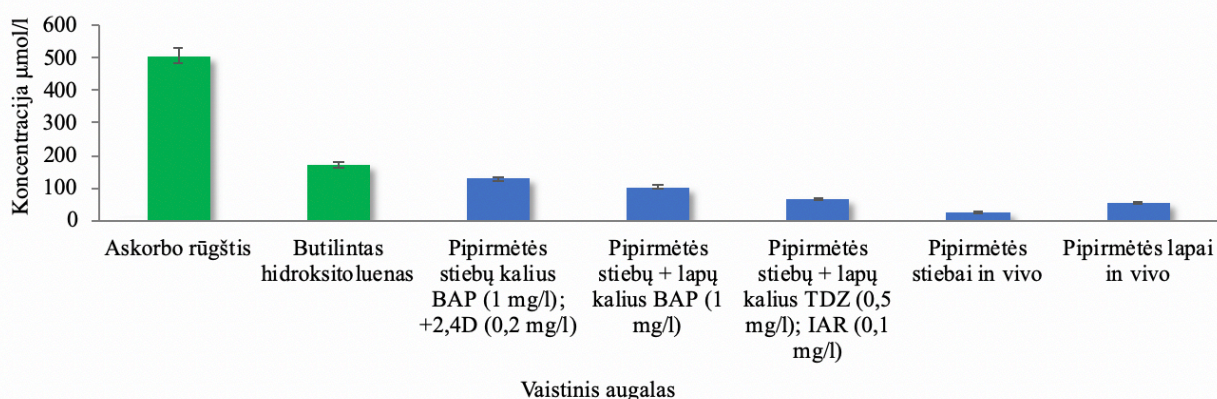
Mahfuz ir kt. [176] tyrė skirtingas pipirmėtės rūšis ir šių FRAP radikalų šalinimo efektyvumą. *M. piperita* iš trijų rūšių pasižymėjo didžiausiu FRAP aktyvumu. Minimalus ir maksimalus *M. piperita* FRAP aktyvumas buvo 317,6 ir 558,33 $\mu\text{mol/l}$. O mūsų tyrime naudoto augalo dalys kito mažesniame aktyvumo diapazone 126,37 ir 411,49 $\mu\text{mol/l}$. Remiantis šio tyrimo rezultatais, FRAP aktyvumo skirtumai *Mentha* mėginiuose buvo susiję su bendra fenolinių junginių koncentracija.

3.1.4. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-triplitidil-s-triaziną su skiedimu



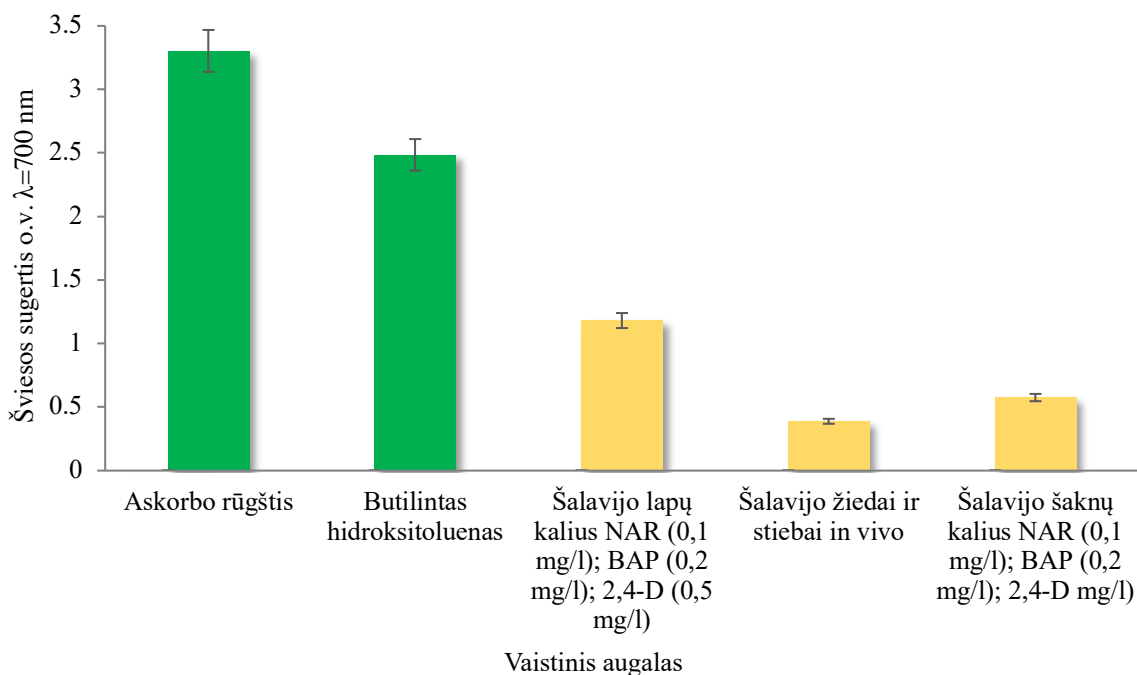
3.7 pav. *S. officinalis* su mažesnėmis ekstrakto koncentracijomis antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą

Pakartojus tyrimą (žr. 3.7 pav.) su mažesnėmis ekstraktų koncentracijomis buvo gautos optimalios šviesos absorbcijos reikšmės, tačiau rezultatų dėsningumas analogiškas tyrimams atliktiems be skiedimo. Didžiausia koncentracija gauta pipirmėtės stiebų kaliaus ekstrakto (128,81 $\mu\text{mol/l}$), po to pipirmėtės stiebų ir lapų mišinio su BAP (1mg/l) augimo reguliatoriumi (101,98 $\mu\text{mol/l}$) bei šalavijo lapų *in vitro* (87,09 $\mu\text{mol/l}$) ekstraktuose, tačiau nei viena iš reikšmių neparodė, geresnių antioksidacinių savybių už askorbo rūgštį (507,09 $\mu\text{mol/l}$). Pipirmėtės stiebų *in vivo* (23,44 $\mu\text{mol/l}$), šalavijo žiedų ir stiebų mišinio *in vitro* (11,24 $\mu\text{mol/l}$) ekstraktai pasižymėjo silpniausiu redukciniu poveikiu.

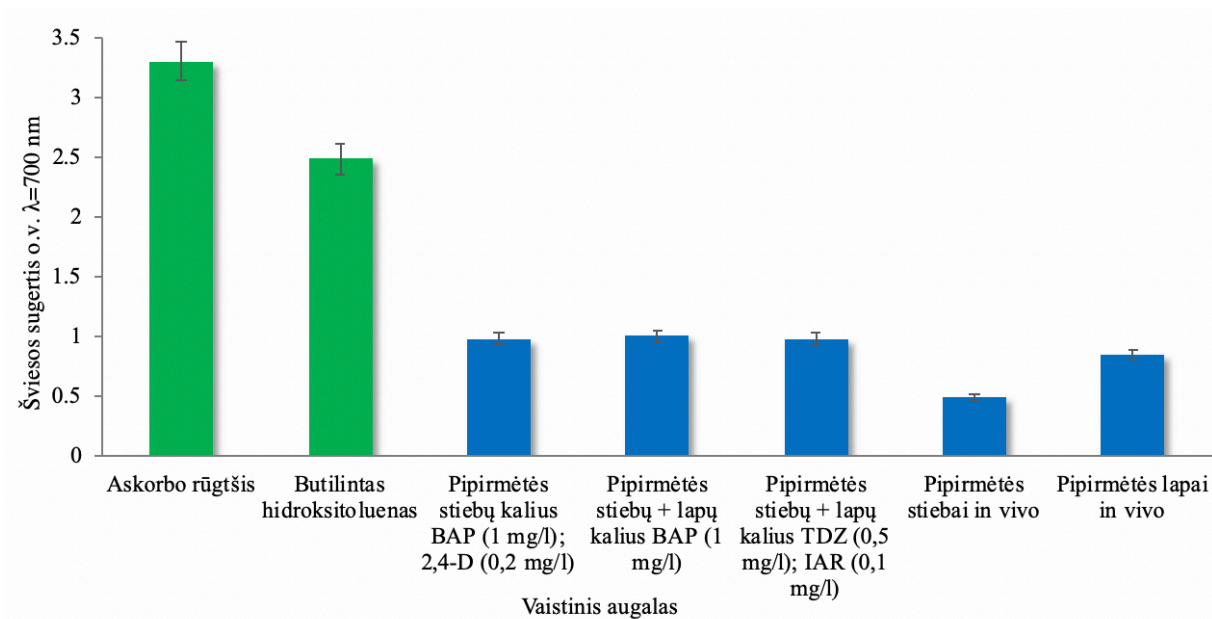


3.8 pav. *M. piperita* su skirtingomis ekstraktų koncentracijomis antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą

3.1.5. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose



3.9 pav. *S. officinalis* ekstraktų redukcinių savybių įvertinimas

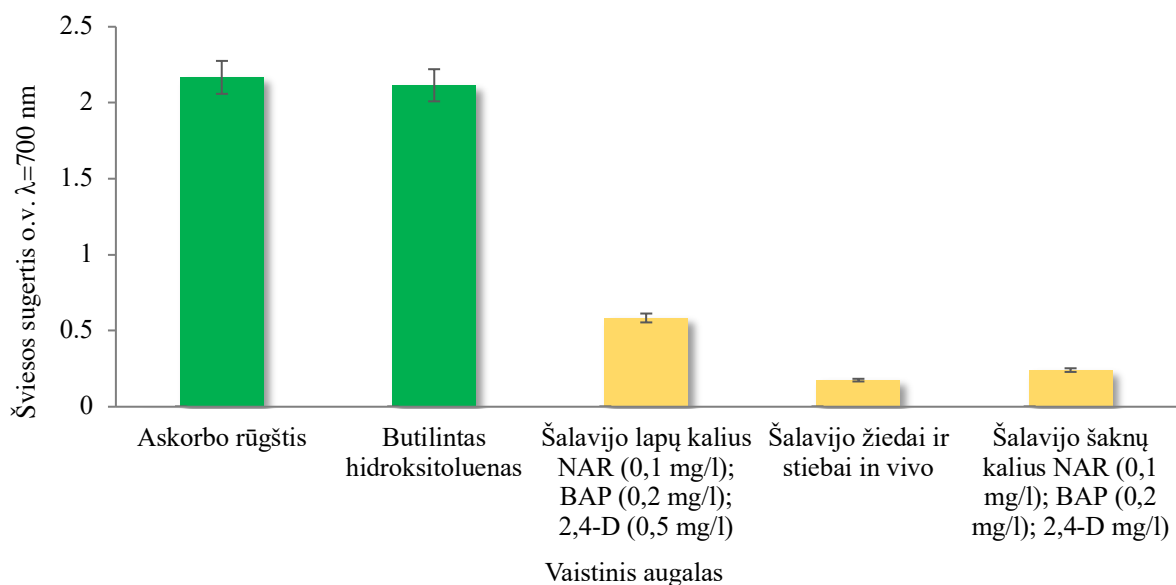


3.10 pav. *M. piperita* ekstraktų redukcinių savybių įvertinimas

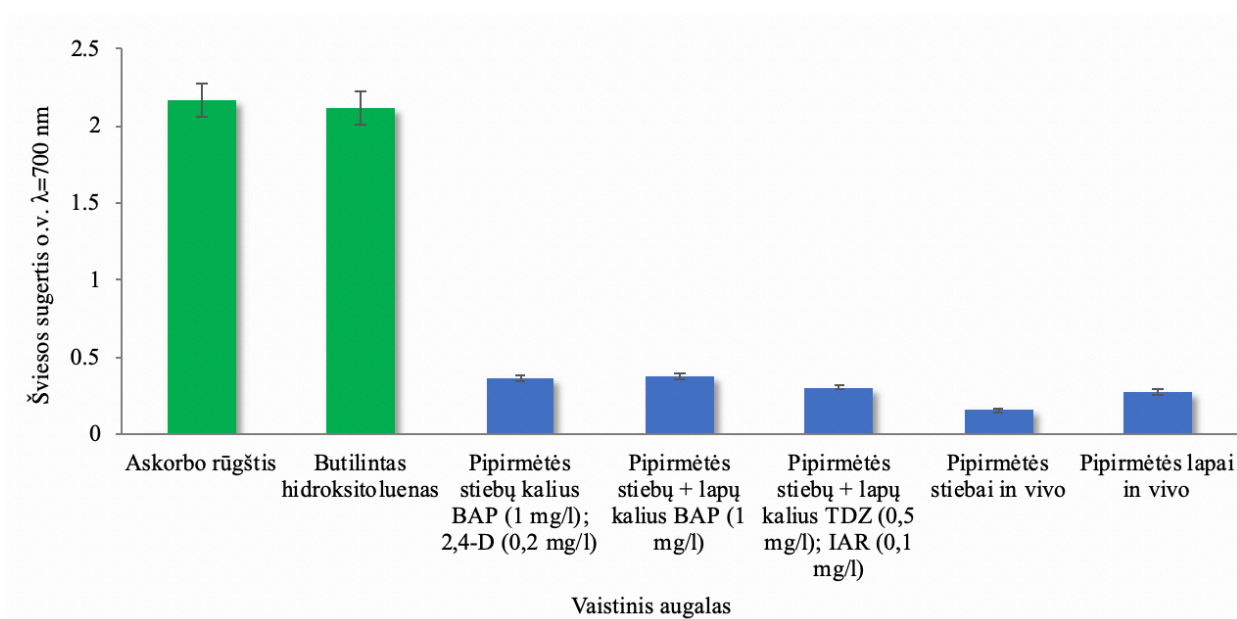
Išmatavus mėginių šviesos sugertis (žr. 3.9–3.10 pav.), didesnes reikšmes pademonstravo vaistinės pipirmėtės kaliaus kultūros augalų ekstraktai, tačiau jos buvo mažesnės nei antioksidantų butilinto hidroksitolueno (2,48) ir askorbo rūgšties (3,30). Šalavijo lapų kaliaus ekstrakto šviesos absorbcija buvo didžiausia (1,18), o mažiausia stiebų ir žiedų mišinio *in vitro* (0,39) ekstrakto. Pipirmėtės stiebų ir lapų kaliaus ekstrakto su BAP (1 mg/l) didžiausia reikšmė siekė (1,00), o mažiausia išmatuota pipirmėtės stiebų *in vivo* ekstrakto (0,49).

Panašūs rezultatai gauti *in vivo* ekstraktuose, kuriuose pipirmėtės lapų bandinių šviesos absorbcija 700 nm bangos ilgyje siekė $0,9 \pm 0,3$ [169].

3.1.6. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose su skiedimu



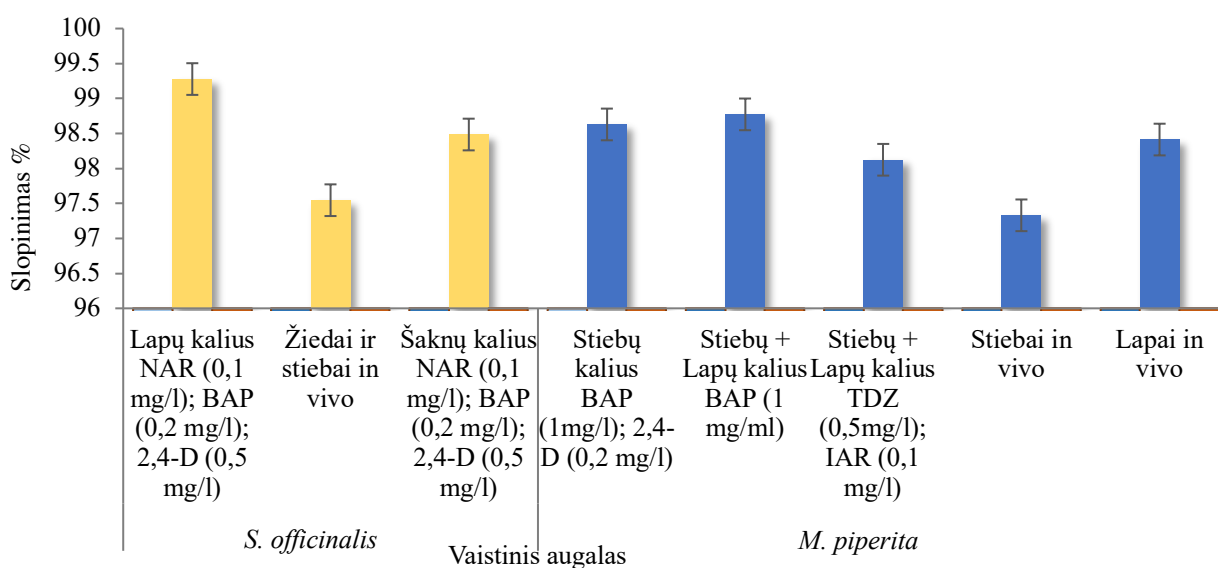
3.11 pav. *S. officinalis* su skirtingomis ekstrakto koncentracijomis redukcinių savybių įvertinimas



3.12 pav. *M. piperita* su skirtingomis ekstraktų koncentracijomis redukcinių savybių įvertinimas

Naudojant skirtingas ekstraktų koncentracijas (žr. 3.11–3.12 pav.), stipriausios redukcinės savybės išliko tų pačių augalų ekstraktuose. Šviesos sugerties dydis (0,58) užfiksuotas šalavijo lapų ekstrakto, o 0,37 pipirmėtės stiebų ir lapų ekstrakto su BAP (1 mg/l). Mažiausios reikšmės šalavijo žiedų ir stiebų mišinio (0,18) ir pipirmėtės stiebų *in vivo* (0,15) ekstraktuose.

3.1.7. Vaistinis augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu

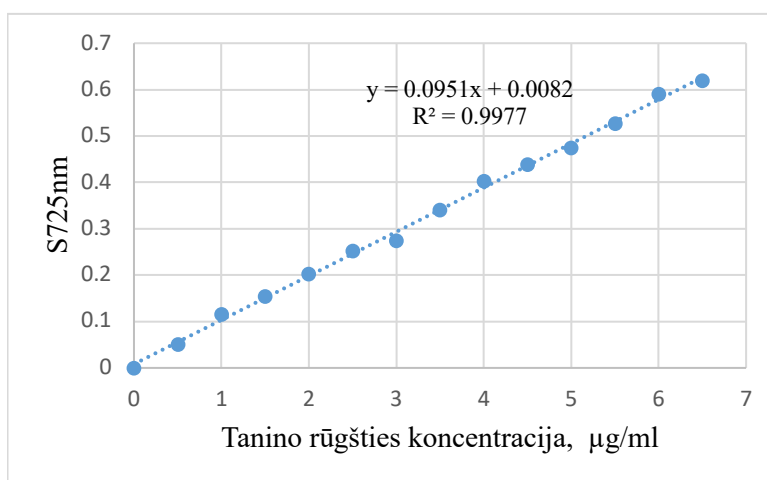


3.13 pav. *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktų antioksidacinio potencialo įvertinimas ABTS tyrimu

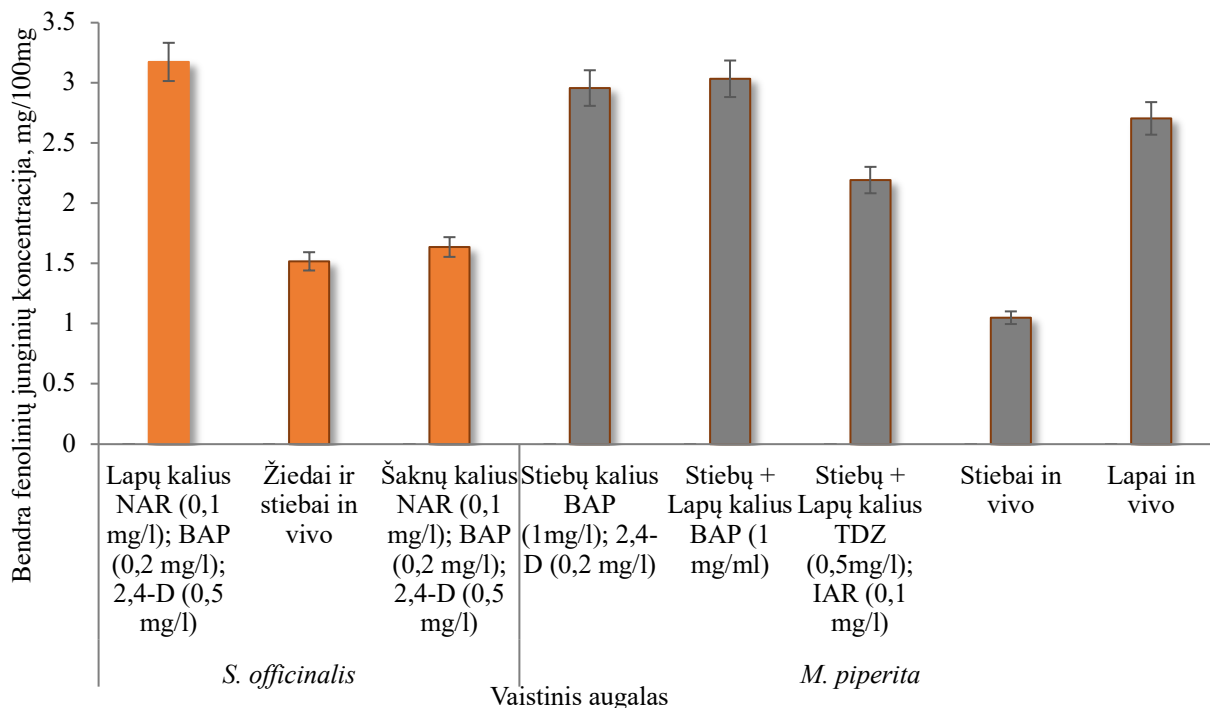
Pateiktuose rezultatuose (3.13pav.), galime matyti, kad naudojant ABTS metodą, didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo vaistinio šalavijų kaliaus kultūrų iš lapų, augintų ant MS terpės su NAR (0,1 mg/l), BAP (0,2 mg/l) ir 2,4-D (0,5 mg/l) terpės, ekstraktas (99,27%), o mažiausiu – šalavijo žiedų ir stiebų *in vivo* ekstraktas (97,54%). Apžvelgiant *M. piperita* aktyvumą, pastebėta, kad geresniu slopinimu pasižymėjo pipirmėtės kaliaus kultūrų ekstraktai nei *in vivo* sąlygomis augintų augalų ekstraktai. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas fiksuotas pipirmėtės stiebų ir lapų kaliaus kultūrų, augintų mitybinėje terpėje su BAP (1 mg/ml) augimo reguliatorimi, ekstrakto (98,77%). Mažesniu aktyvumu pasižymėjo kaliaus stiebų kultūrų, augintų ant BAP (1 mg/ml) ; 2,4-D (0,2 mg/l) terpės, ekstraktas bei stiebų ir lapų, augintų ant TDZ (0,5 mg/l) IAR (0,1 mg/l) terpės, ekstraktas (atitinkamai 98,63% ir 98,12%), o mažiausiu – stiebų, augintų *in vivo* sąlygomis, ekstraktas (97,33%).

3.2. Bioaktyvių metabolitų tyrimai

3.2.1. Bendras fenolinių junginių įvertinimas Folino-Kiokalto metodu



3. 14 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

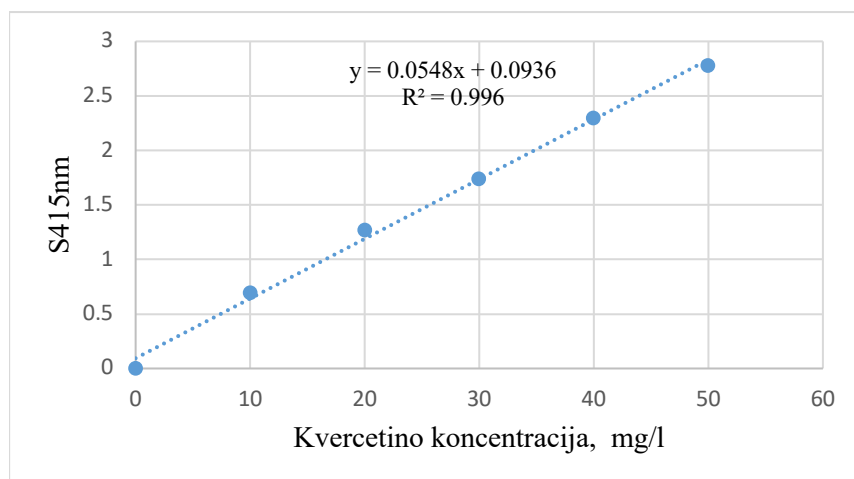


3.15 pav. Bendra fenolinių junginių koncentracija (mg/100mg) *S. officinalis* ir *M. piperita* vaistinių augalų ekstraktuose

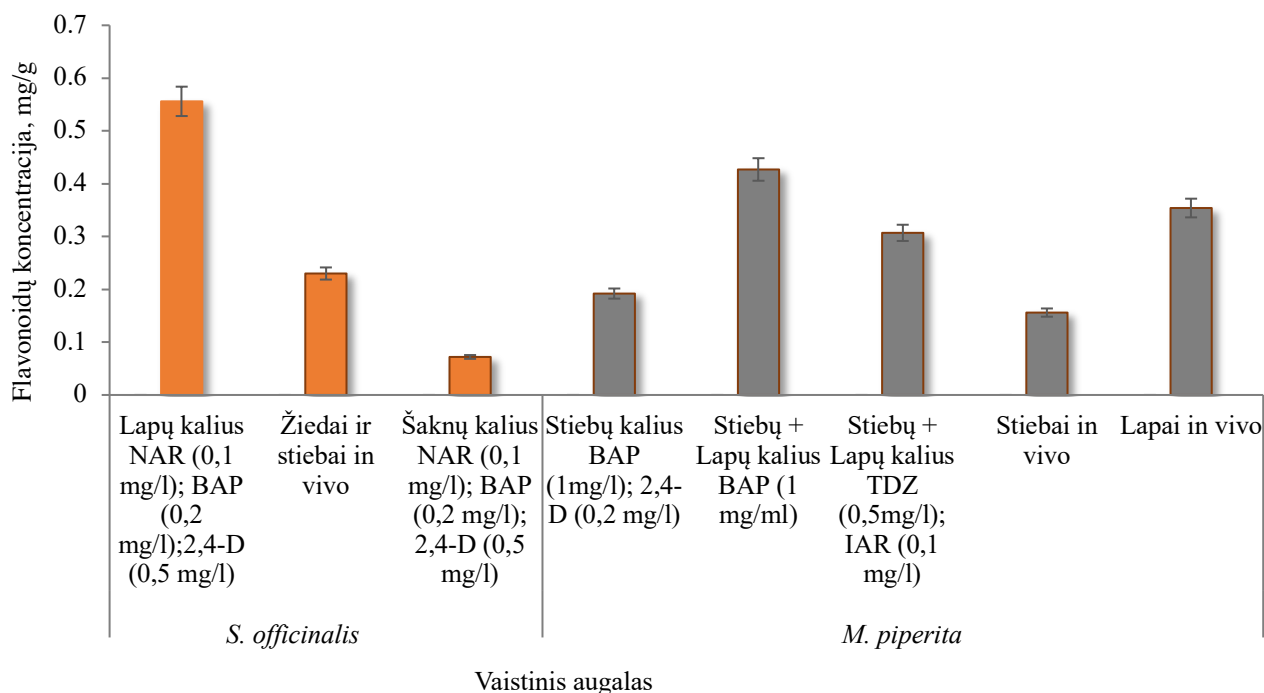
Po atliktos fenolinių junginių analizės Folino-Kiokalto metodu (žr. 3.15 pav), didžiausia šių junginių koncentracija pasižymėjo šalavijo lapų kaliaus ekstraktas – 3,17 mg/100 mg. Aukštos reikšmės gautos ir pipirmėtės stiebų ir lapų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su BAP, ekstrakto – 3,03 mg/100mg bei pipirmėtės stiebų kaliaus, auginto MS terpėje su BAP; 2,4-D, ekstrakto – 2,96 mg/100mg. Pipirmėtės lapų *in vivo*, stiebų ir lapų kaliaus kultūrų, augintų su TDZ; IAR, ekstrakto bei stiebų *in vivo* ekstraktų koncentracijos siekė 1,05–2,70 mg/100 mg. Šalavijo šaknų kaliaus, taip pat žiedų ir stiebų mišinio *in vitro* ekstraktuose ir pipirmėtės stiebuose *in vivo* buvo mažiausios fenolinių junginių koncentracijos (atitinkamai 1,05, 1,64 ir 0,52 mg/100mg).

Bendra fenolinių junginių koncentracija *in vivo* pagal įvairių šalavijų ekstraktų absorbcijos vertes, reaguojant su Folino-Kiokalto reagentu buvo tirta Hassan ir kt. [167]. Didžiausią koncentraciją fenolinių junginių tyrėjai nustatė šalavijo etanolio ekstrakto – $0,94 \pm 0,01$ mg/100mg, o mažiausią užfiksavo šalavijo eteriniame aliejuje – $0,07 \pm 0,003$ mg/100 mg. Šiuos rezultatus, lyginant su mūsų atliktais, šalavijo *in vivo* kultūra pasižymėjo mažesne fenolinių junginių koncentracija 0,52 mg/100 mg, tačiau lapų kaliaus kultūra su augimo reguliatoriais, tris kartus viršijo didžiausią aptiktą kitų tyrėjų koncentraciją ir siekė 3,17 mg/100 mg. Pipirmėtės ekstrakto bendra fenolinių junginių koncentracija taip pat buvo tris kartus didesnė, lyginant su kitų mokslininkų darbu *in vivo* [173].

3.2.2. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas



3. 16 pav. Kalibracinė kreivė pagal kvercetiną



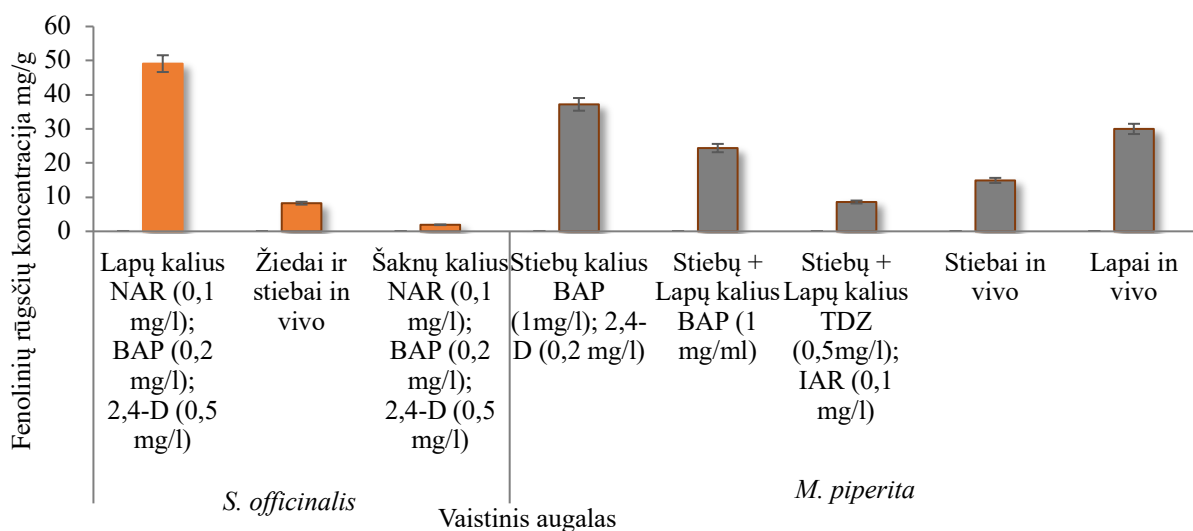
3.17 pav. Flavonoidų koncentracija mg/g *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose

Iš gautų tyrimų rezultatų galime pastebėti (žr. 3.17 pav.), kad didžiausia bendra flavonoidų koncentracija sukaupta augalų lapų, šalavijo kaliaus kultūrų ekstraktuose siekė – 0,556 mg/g, o pipirmėtės lapų ir mišinio BAP – 0,427 mg/g. Šiek tiek mažesniais reikšmėmis pasižymėjo pipirmėtės lapų *in vivo* bei stiebų ir lapų mišinio TDZ; IAR (atitinkamai 0,354 ir 0,307 mg/g) ekstraktai. Šalavijo šaknų kaliaus kultūrų ekstraktas parodė mažiausią šių antrinių metabolitų koncentraciją – 0,072 mg/g.

Choukairi ir kt. [171] gauti rezultatai parodė, kad šalavijo lapų eksplantai, auginami MS terpėje su (0,5 mg/ l) 2,4-D ir (0,5 mg/l) BAP, turėjo 65% didesnę bendrą flavonoidų koncentraciją nei mūsų

pasiekto geriausio rezultato mėginys naudojant BAP (1 mg/l). Mier ir kt. [173] flavonoidų koncentracijos tyrimuose su natūraliai auginta pipirmete, aptiko analogiškas reikšmes, lyginant su mūsų bandiniais, kuriuose naudoti augimo reguliatoriai ($0,379 \pm 0,037 \text{ mg/g}$), tačiau 12% mažesnes lyginant su mėginiais *in vivo*.

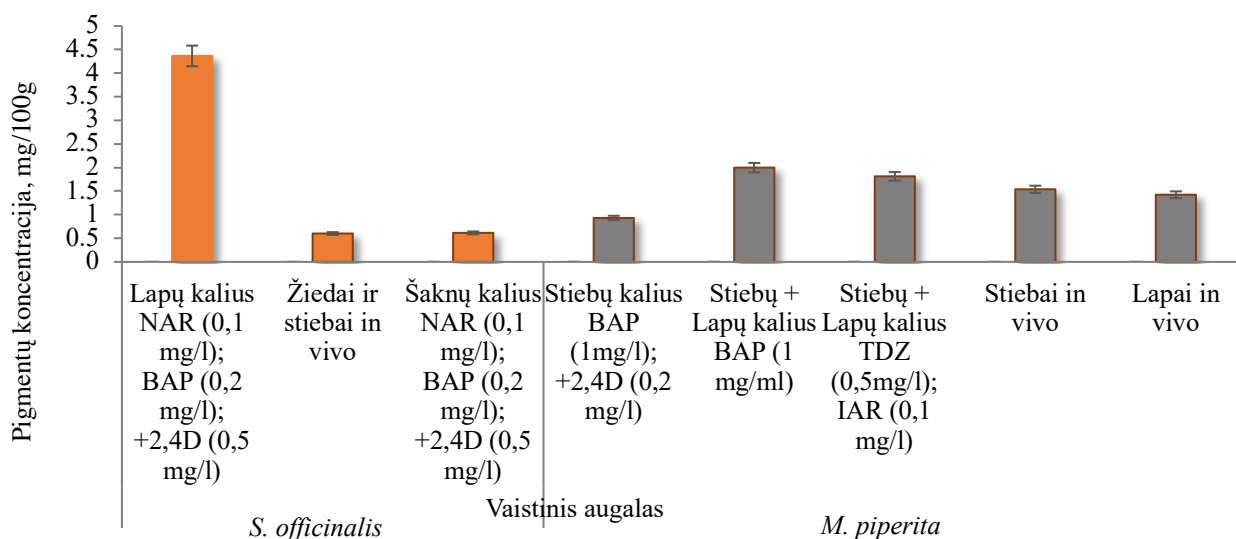
3.2.3. Bendras fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje



3. 18 pav. Fenolinių rūgščių koncentracija mg/g *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose

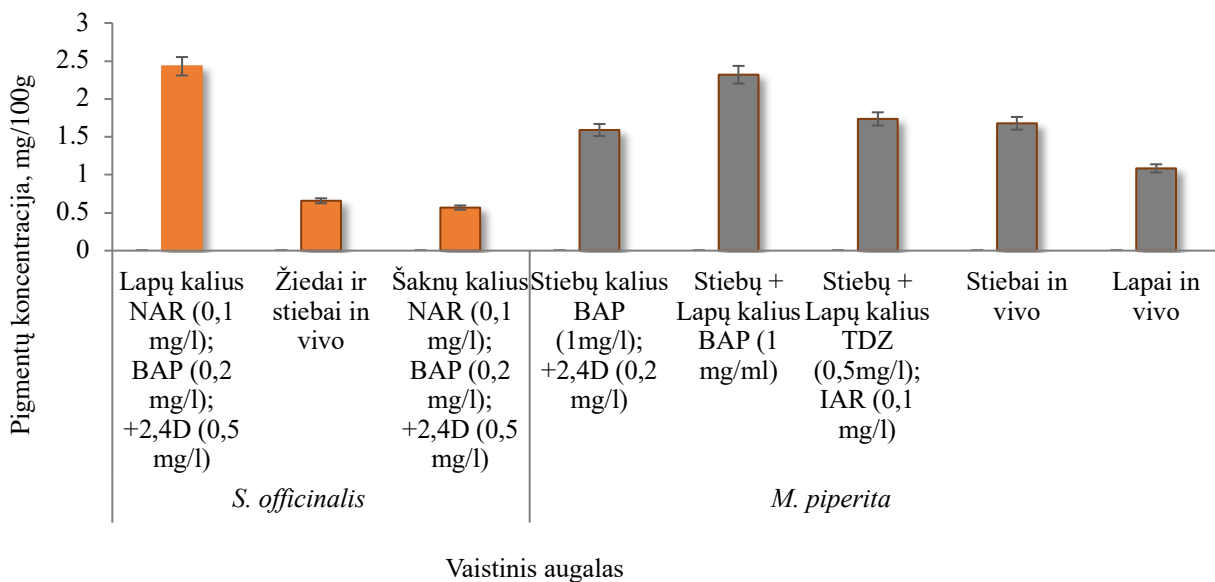
Pateikti duomenys (žr. 3.18 pav.) parodė, kad bendra fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį įvairiose augalų dalyse skyrėsi. Fenolinių rūgščių koncentracija pagal kavos rūgštį buvo didžiausia šalavijo lapų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su NAR (0,1 mg/l), BAP (0,2 mg/l), 2,4-D (0,5 mg/l), ekstrakto (49,12%). Be to, didelės fenolinių rūgščių koncentracijos buvo rastos pipirmėtės lapų ir stiebų mišiniuose *in vitro* ir pipirmėtės lapuose *in vivo* (atitinkamai 37,19 ir 30,00%) ekstraktuose. Mažiausias rezultatas buvo fiksuotas šalavijo šaknų kaliaus kultūros *in vitro* ekstrakto (1,92%).

3.2.4. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų nustatymas vaistiniuose augaluose



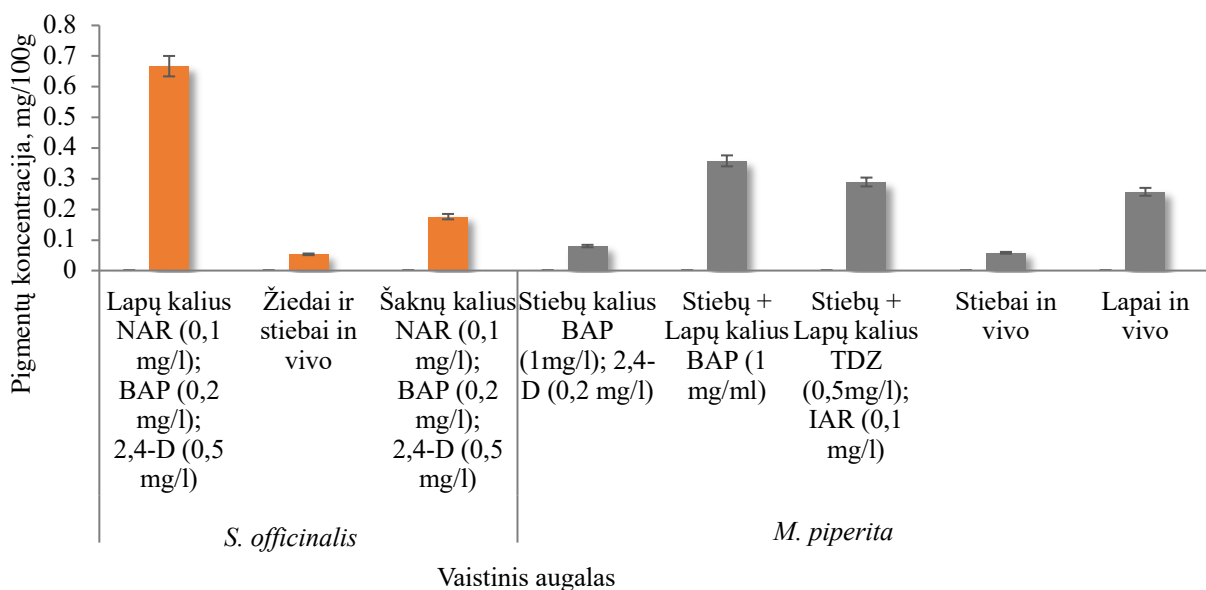
3. 19 pav. Chlorofilo *a* koncentracija mg/100g *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose

Chlorofilo *a* koncentracija įvertinta (žr. 3.19 pav.) matuojant spektrofotometrines charakteristikas. Didžiausia chlorofilo *a* vertė 4,37 mg/100g atitinkamai buvo rasta šalavijo lapų kaliaus kultūrų ekstrakte. Dvigubai mažesnės vertės išmatuotos pipirmėtės kaliaus stiebų ir stiebų ir lapų mišinyje su BAP, 2,4-D augimo reguliatoriais (atitinkamai 0,93 ir 1,81 mg/100g) ekstrakte. Mažiausia pigmentų koncentracija fiksuota šalavijo žiedų ir stiebų *in vitro* mišinio – 0,60 mg/100g ekstrakte.



3.20 pav. Chlorofilo *b* koncentracija mg/100g *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose

Pagal gautus rezultatus (žr. 3.20 pav.), chlorofilo *b* didžiausia koncentracija buvo aptikta šalavijo lapų kaliaus (2,43 mg/100g) ir pipirmėtės stiebų ir lapų su augimo reguliatoriumi BAP (2,32 mg/100g) ekstraktuose. Mažiausios reikšmės 0,66 ir 0,56 mg/100g atitinkamai gautos šalavijo žiedų ir stiebų mišiniui *in vitro* bei šalavijo šaknų *in vitro* ekstraktuose.

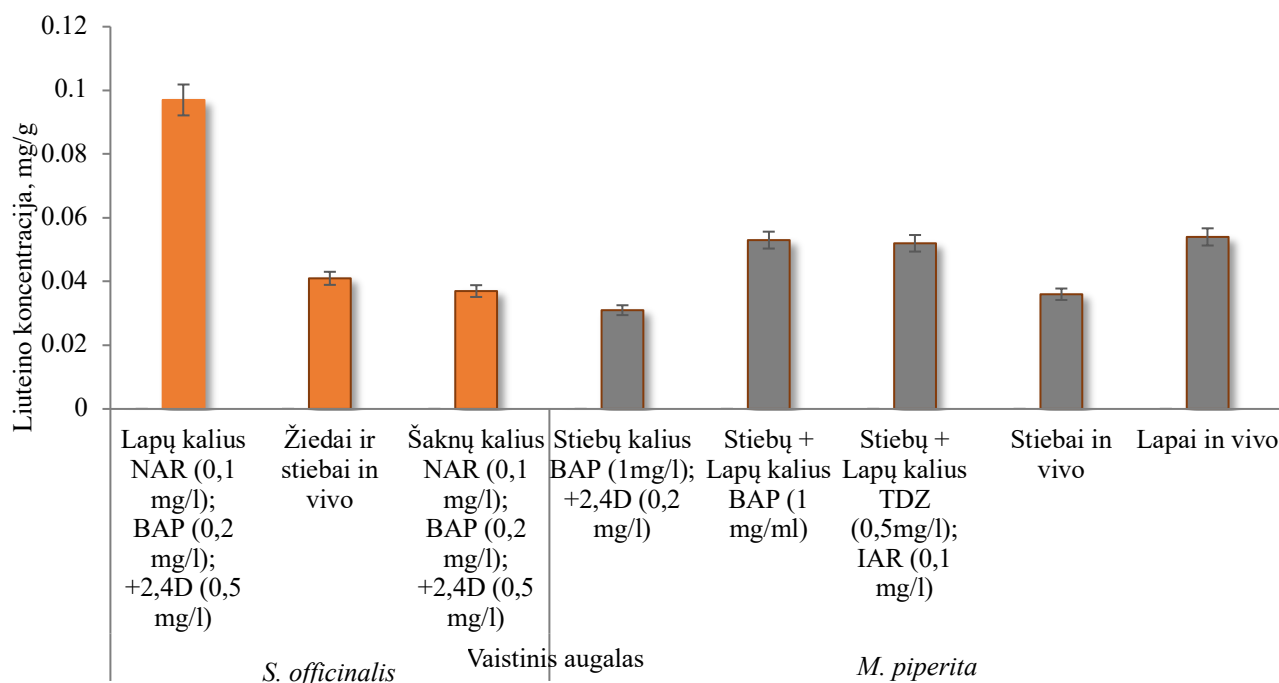


3.21 pav. Karotinoidų koncentracija mg/100g *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose

Pagal gautus rezultatus (žr. 3.21 pav.), didžiausia koncentracija 0,67 mg/100g buvo gauta šalavijų lapų kaliaus ekstrakto. Artimos reikšmės rastos pipirmėtės stiebų ir lapų su TDZ; IAR ir BAP (atitinkamai – 0,29 ir 0,36, mg/100g) ekstrakto. Mažiausia reikšmė pipirmėtės stiebų *in vivo* 0,06 mg/100g, o šalavijo žiedų ir stiebų mišinyje *in vitro* 0,05 mg/100g ekstraktuose.

Mokslininkai atlikę karotinoidų ir chlorofilo ekstrahavimą klasikiniu būdu gavo panašius rezultatus (chlorofilas *a* 1,45±0,23; chlorofilas *b* 2,58±0,04 mg/100g), tačiau pakeitę ekstrahavimo techniką reikšmingai paveikė bendrą fitocheminių junginių koncentraciją. Ultragarso ekstrahuojant pipirmėtės lapus chlorofilo *a* koncentracija buvo net 62%, o chlorofilo *b* 54% didesnis, lyginant su maceracijos būdu ekstrahuotais mėginiais [174]. Kitų tyrėjų darbe šalavijo bandiniuose ekstrahuotuose įprastu būdu gautos artimos chlorofilo *a* vertės (0,6-3,95 mg/100g) ir mažesnės chlorofilo *b* (0,28-0,97 mg/100g) [175].

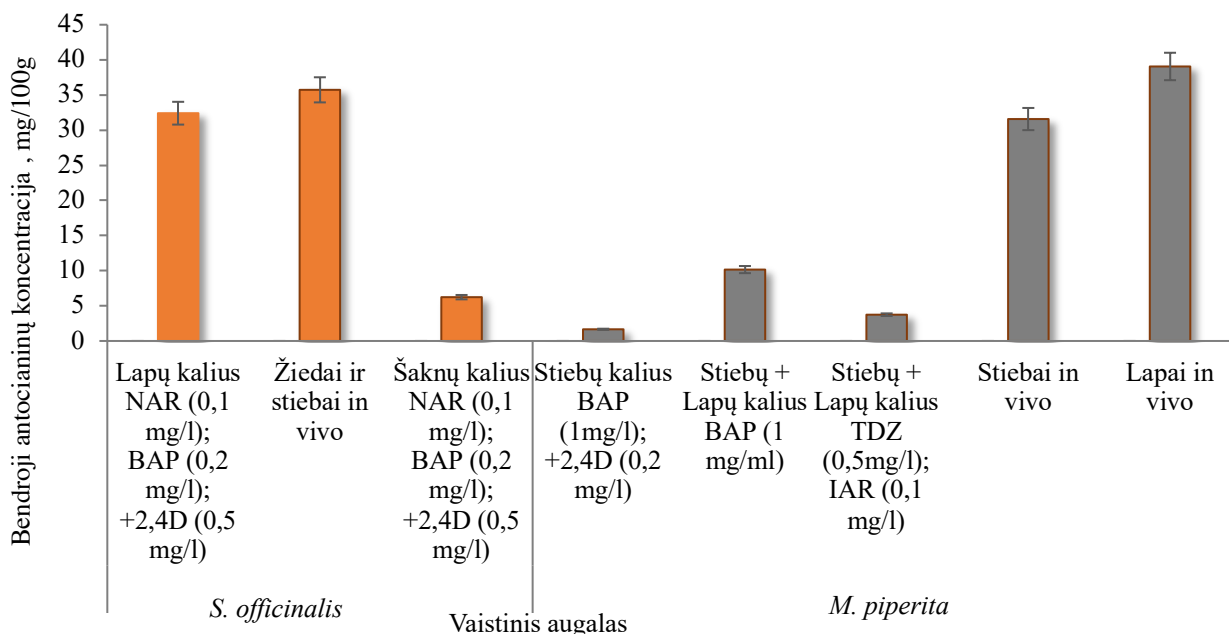
3.2.5. Liuteino koncentracijos įvertinimas augaluose



3.22 pav. Liuteino koncentracija mg/g *S. officinalis* ir *M. piperita*

Įvykdžius liuteino koncentracijos nustatymą augaluose, matome (žr. 3.22 pav), kad teorija pasitvirtina ir didžiausios liuteino koncentracijos buvo šalavijo lapų kaliaus (0,097 mg/g) ir pipirmėtės lapų *in vivo* (0,054 mg/g) ekstraktuose. Nepriklausomai nuo augimo reguliatorių, artima liuteino koncentracija rasta pipirmėtės stiebų ir lapų mišinio ekstraktuose ir svyruoja 0,052-0,053 mg/g ribose. Mažos koncentracijos aptiktos šalavijo žiedų ir stiebų mišinio bei šaknų kaliaus ekstraktuose (atitinkamai – 0,041 ir 0,037 mg/g), o mažiausia koncentracija užfiksuota pipirmėtės stiebuose kaliaus BAP, 2,4-D ekstrakto - 0,031 mg/g.

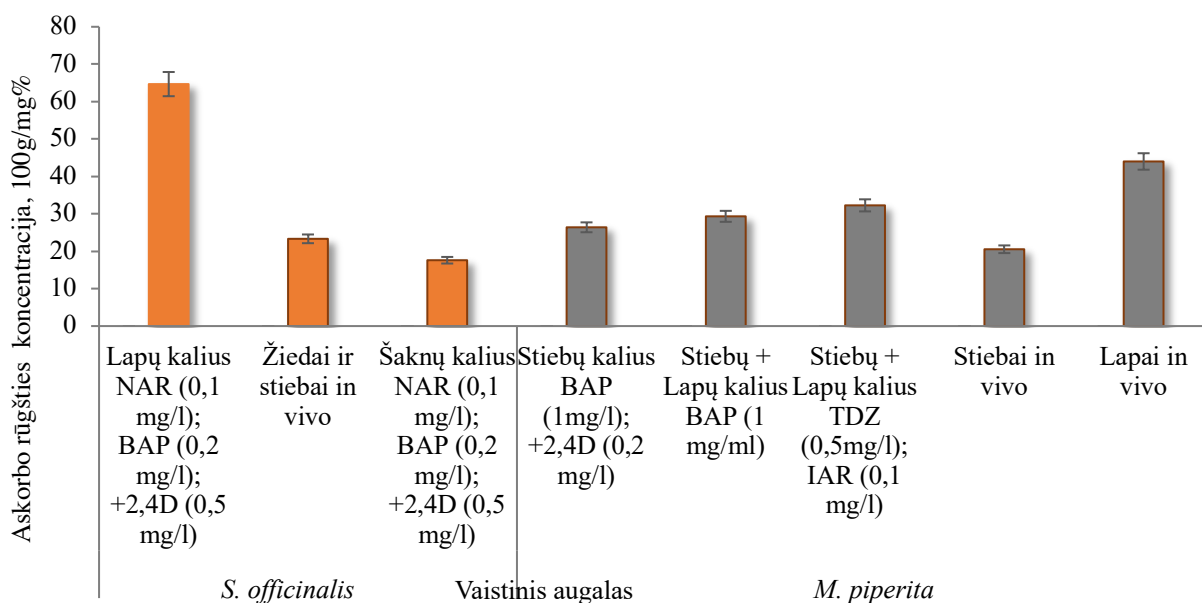
3.2.6. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas pipirmėteje ir šalavijuje



3.23 pav. Bendroji antocianinų koncentracija mg/100g *S. officinalis* ir *M. piperita* vaistinių augalų ekstraktuose

Iš gautų rezultatų nustatyta (žr. 3.23 pav.), kad *M. piperita* lapų *in vivo* ekstrakto buvo gauta didžiausia antocianinų koncentracija – 39,058 mg/100g. Vaistinio šalavijo žiedų ir stiebų mišinio ekstraktas taip pat turėjo didelę antocianinų koncentraciją – 35,734 mg/100g. Šių junginių koncentracija šalavijo lapų kaliaus ekstrakto buvo – 32,410 mg/100g, o pipirmėtės stiebų *in vivo* – 31,578 mg/100g ekstrakto. Mažiausia koncentracija buvo pipirmėtės kaliaus stiebų, augintų MS terpėje su BAP ir 2,4-D - 1,662 mg/100g, ekstrakto.

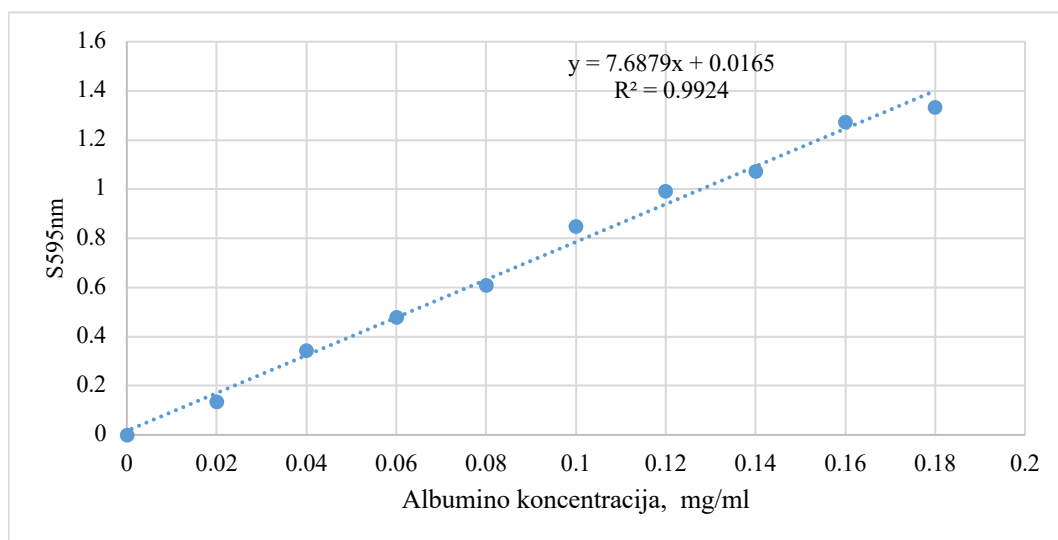
3.2.7. Askorbo rūgšties kiekybinis įvertinimas augaluose



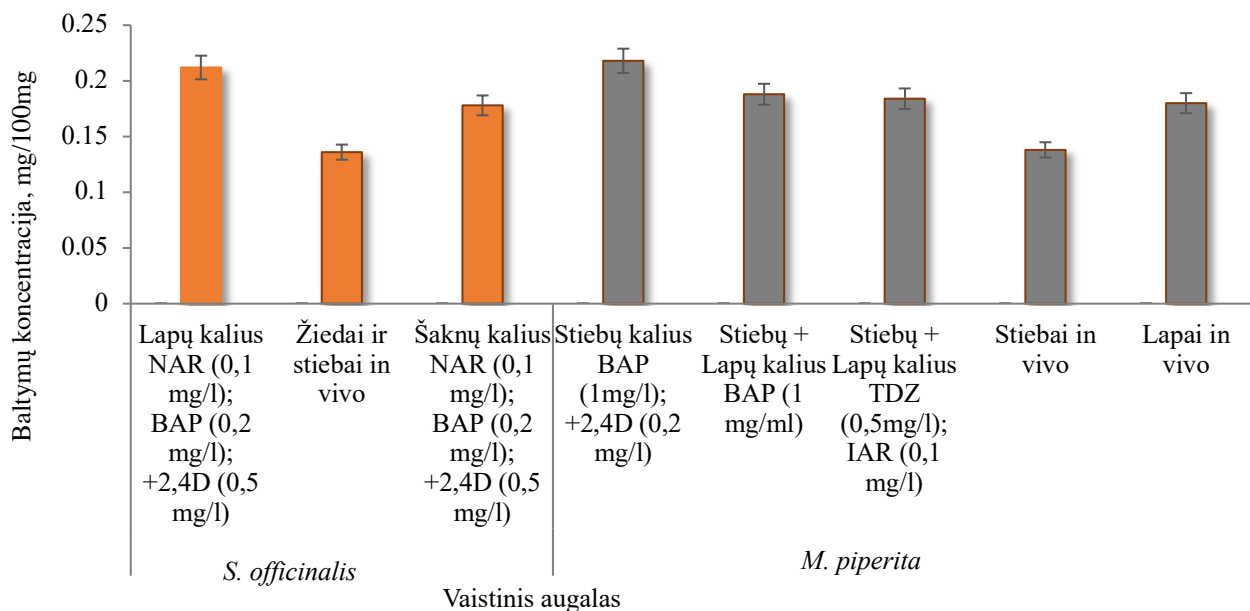
3.24 pav. Askorbo rūgšties koncentracija 100g/mg% *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose

Iš rezultatų pastebima tendencija (žr. 3. 24 pav.) , kad didžiausia askorbo rūgšties koncentracija kaupiasi tiriamųjų augalų lapų ekstraktuose. Šalavijo ekstrakte gauta askorbo rūgšties koncentracija - 64,68 100g/mg, o pipirmėtės – 44, 00 100g/mg. Pipirmėtės stiebų bei lapų ir stiebų mišinių kaliaus kultūrų ekstraktuose koncentracijos svyruoja 26,40 - 32,27 100g/mg ribose. Mažiausia askorbo rūgšties koncentracija fiksuota šalavijo šaknų kaliaus ekstrakto - 17,60 100g/mg.

3.2.8. Baltymų koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje.



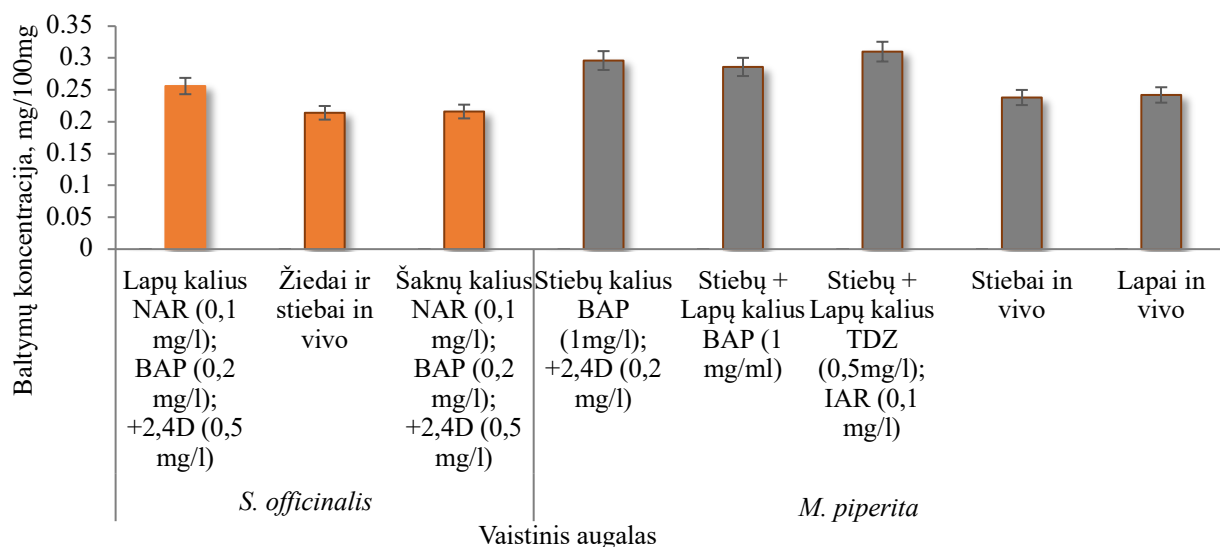
3. 25 pav. Kalibracinė kreivė pagal albuminą



3.26 pav. Baltymų koncentracija mg/100mg *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose, naudojant natrio acetato buferį

Atlikus spektroskopinę analizę (žr. 3.26 pav.), baltymų koncentracijai tirpaluose matuoti, didžiausi rezultatai matomas pipirmėtės stiebų kaliaus kultūrose, augintose MS terpėje su BAP (1 mg/l); 2,4-D (0,218 mg/100mg) ir šalavijo lapų *in vitro* (0,212 mg/100mg) ekstraktuose. Šalavijo šaknų kaliaus, pipirmėtės stiebų ir lapų kalius mišinio TDZ; IAR ir BAP ekstraktuose reikšmės svyravo 0,178- 0,188

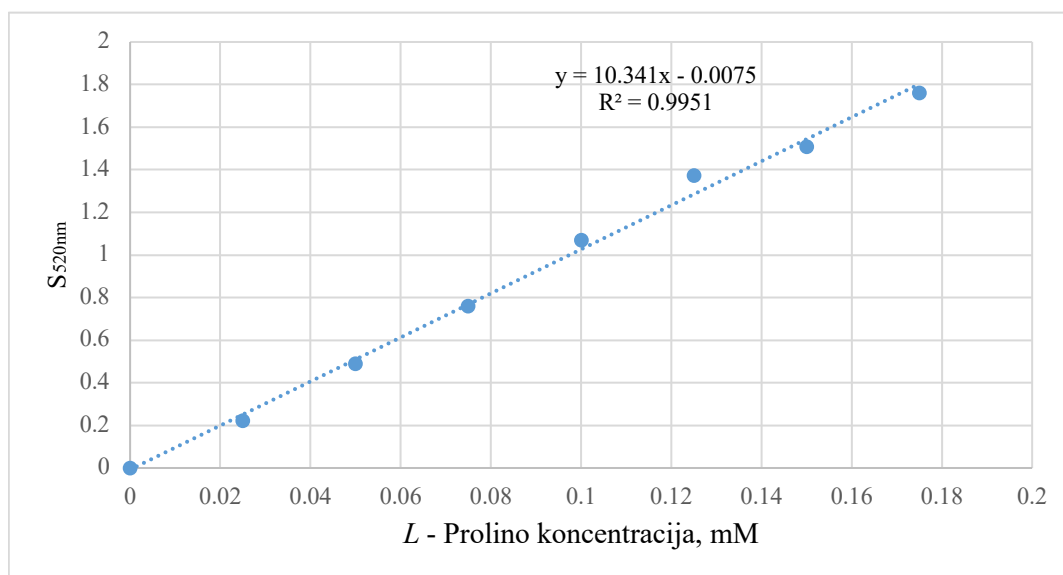
mg/100mg diapozone. O mažiausios reikšmės pipirmėtės stiebų *in vivo* (0,138 mg/100mg) bei šalavijo žiedų ir stiebų mišinio *in vitro* (0,136 mg/100mg) ekstraktuose.



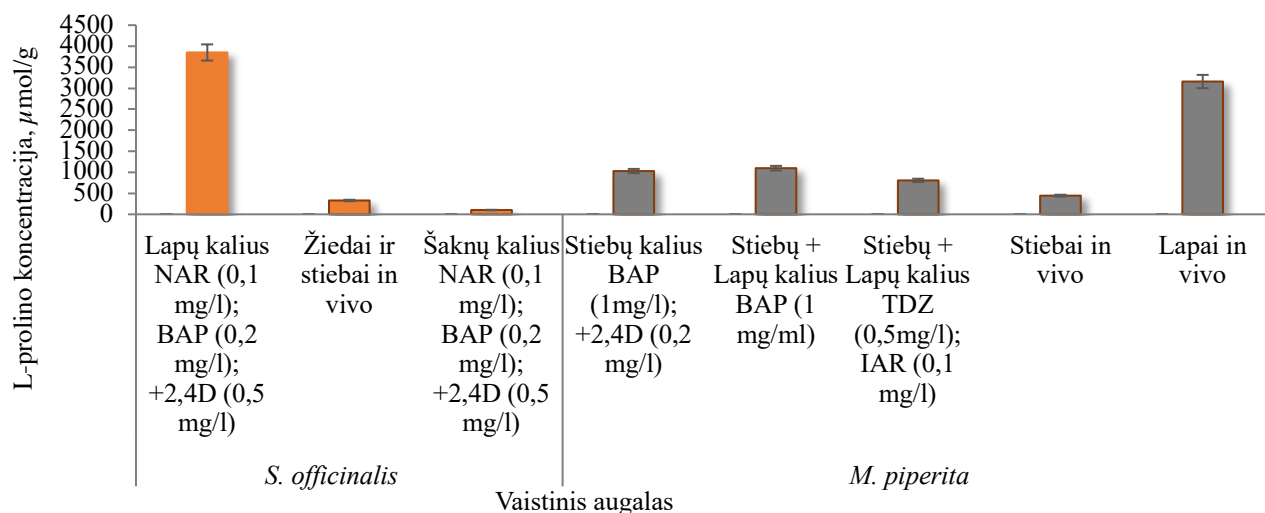
3.27 pav. Baltymų koncentracija mg/100mg *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose, naudojant natrio borato buferį

Po baltymų koncentracijos nustatymo vykdyto su natrio borato buferiu pastebėta, kad didžiausios koncentracijos aptiktos pipirmėtės kaliaus kultūrų, stiebų, lapų ir stiebų mišiniuose augintuose su skirtingais augimo reguliatoriais, ekstraktuose ir svyravo nuo 0,286 iki 0,310 mg/100mg. 0,216 mg/100mg ir 0,214 mg/100mg atitinkamai buvo dvi mažiausios koncentracijos šalavijo šaknų ir žiedų bei stiebų mišinio *in vivo* ekstraktuose.

3.2.9. L-prolino koncentracijos įvertinimas



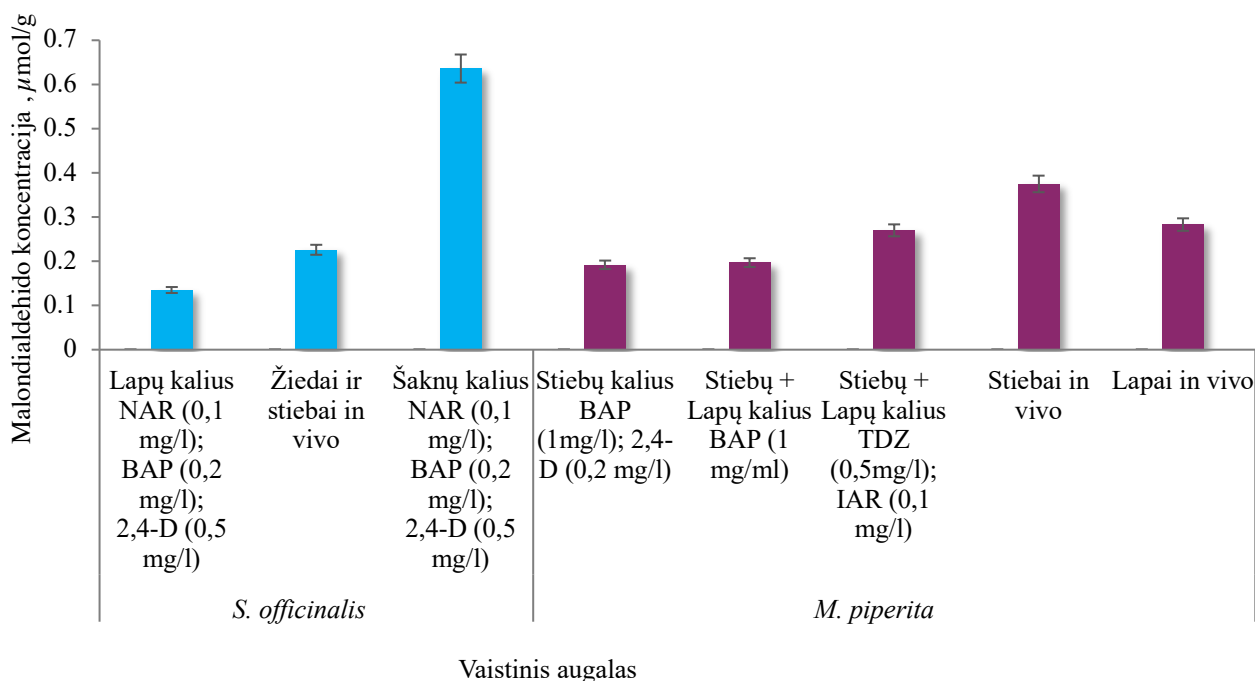
3. 28 pav. L- Prolino kalibracinė kreivė



3.29 pav. L-proolino koncentracijos (µmol/g) įvertinimas *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose

Iš pateiktų rezultatų galime matyti (žr. 3.29 pav.), kad didžiausios L-proolino koncentracijos kaupiamos augalų lapų, tiek *in vitro*, tiek *in vivo* ekstraktuose. Vaistinio šalavijo ekstrakto L-proolino rasta 3850,67 µmol/g, o pipirmėtės – 3159,25 µmol/g. Mažesnės koncentracijos aptiktos pipirmėtės lapų ir stiebų mišinio kaliaus BAP; BAP ir 2,4-D ekstrakto bei lapų ir stiebų mišinio TDZ; IAR (atitinkamai 1097,80; 1028,85; 806,90 µmol/g) ekstraktuose. Šalavijo šaknų kaliaus kultūrų ekstraktams būdinga mažiausia L-proolino koncentracija – 102,40 µmol/g.

3.2.10. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas



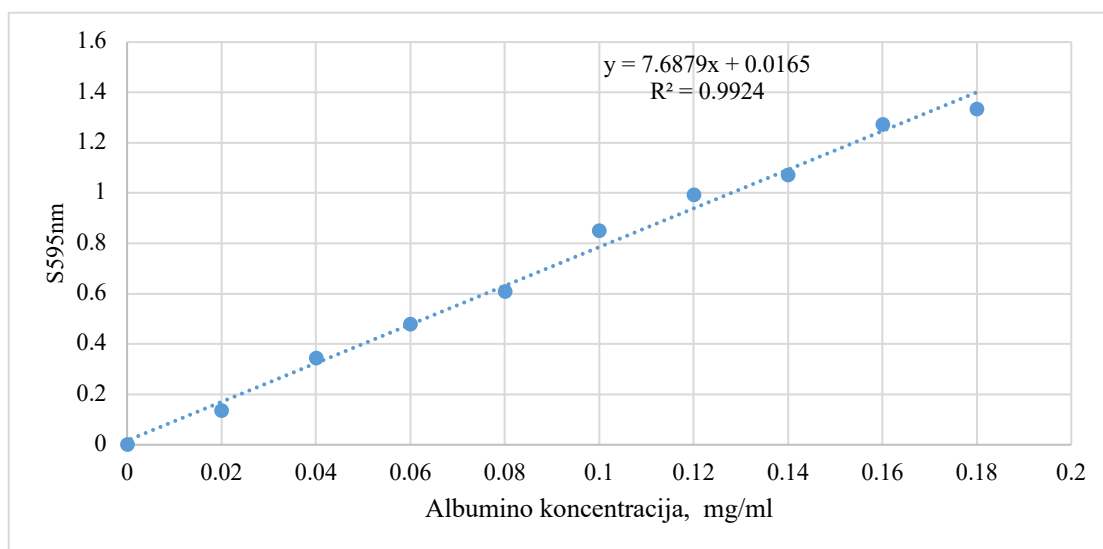
3.30 pav. *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktų malondialdehido koncentracijos nustatymas

Pagal gautus tyrimų rezultatus (žr. 3.30 pav.) matome, kad didesnes malondialdehido koncentracijas kaupė šalavijo ekstraktai. Šaknų kaliaus ekstrakto MDA koncentracija siekė 0,636 µmol/g. Pipirmėtės stiebų ekstrakto MDA koncentracija dvigubai mažesnė nei šalavijo lapų ekstrakto – 0,375 µmol/g.

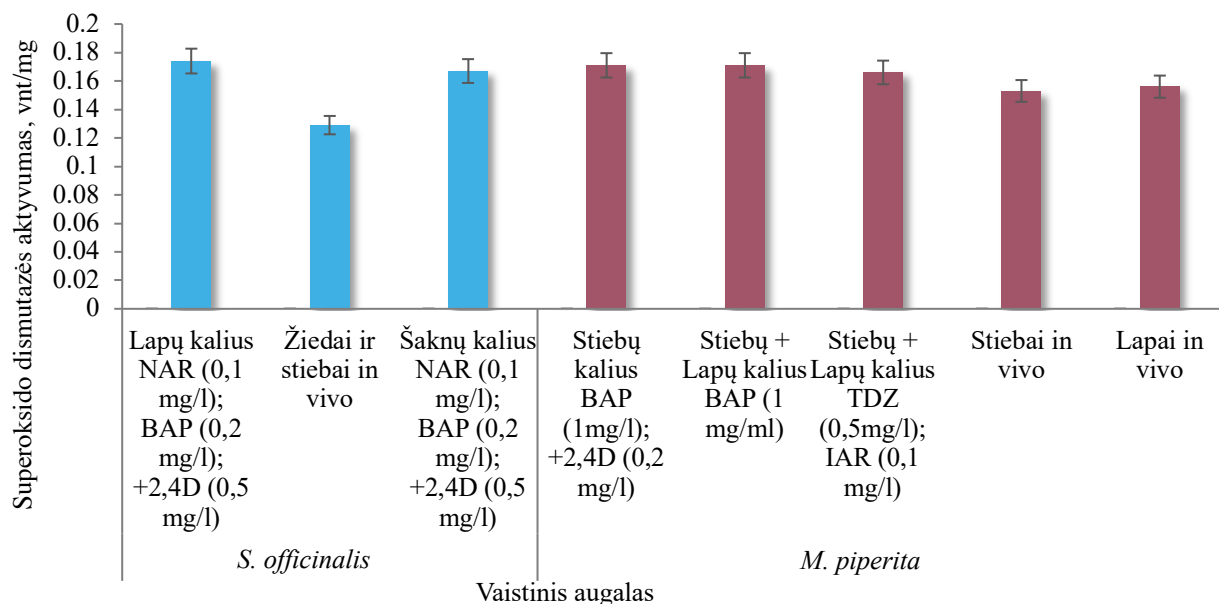
Pipirmėtės kaliaus kultūros, stiebų, stiebų ir lapų mišinių, augintų MS terpėje su BAP ir TDZ, IAR, ekstraktų koncentracija siekė 0,197 - 0,270 $\mu\text{mol/g}$. O mažiausią MDA koncentraciją kaupė šalavijo lapų kaliaus ekstraktas – 0,135 $\mu\text{mol/g}$.

3.3. Antioksidacinių fermentų nustatymas

3.3.1. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas



3.31 pav. Kalibracinė kreivė pagal albuminą

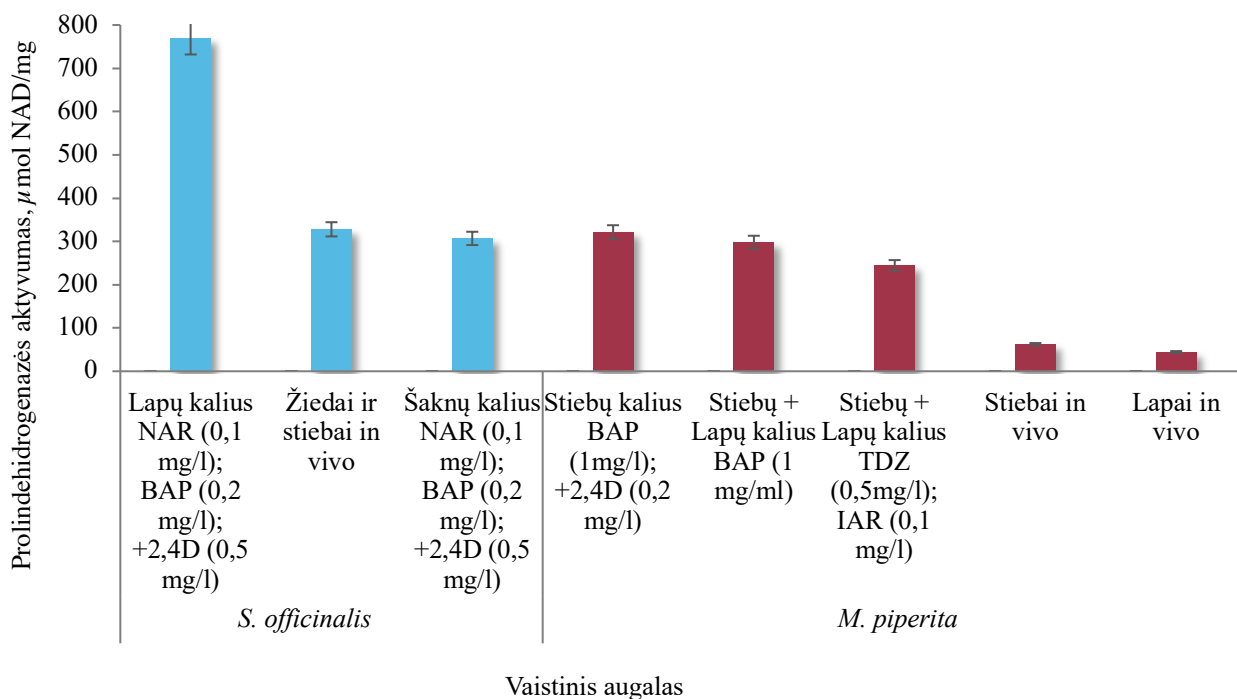


3.32 pav. *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktų fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Tyrimų rezultatai (žr. 3.32 pav.) parodė, kad fermento superoksido dismutazės aktyvumas buvo apylygis nepriklausomai nuo augalo ar jo dalies. Didžiausias šio fermento aktyvumas buvo šalavijo lapų ekstrakte – 0,174 vnt/mg. Vienodas fermento aktyvumas pasiektas pipirmėtės stiebų, augintų MS terpėje su BAP, ir lapų ir stiebų mišinio ekstraktuose – 0,171 vnt/mg. Šalavijo šaknų, pipirmėtės

lapų, stiebų ir lapų mišinio TDZ; IAR ekstraktų fermentų aktyvumas svyravo 0,153–0,167 vnt/mg diapazone. Šalavijo žiedų ir stiebų mišinio ekstrakto aktyvumas buvo mažiausias – (0,129 vnt/mg).

3.3.2. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas



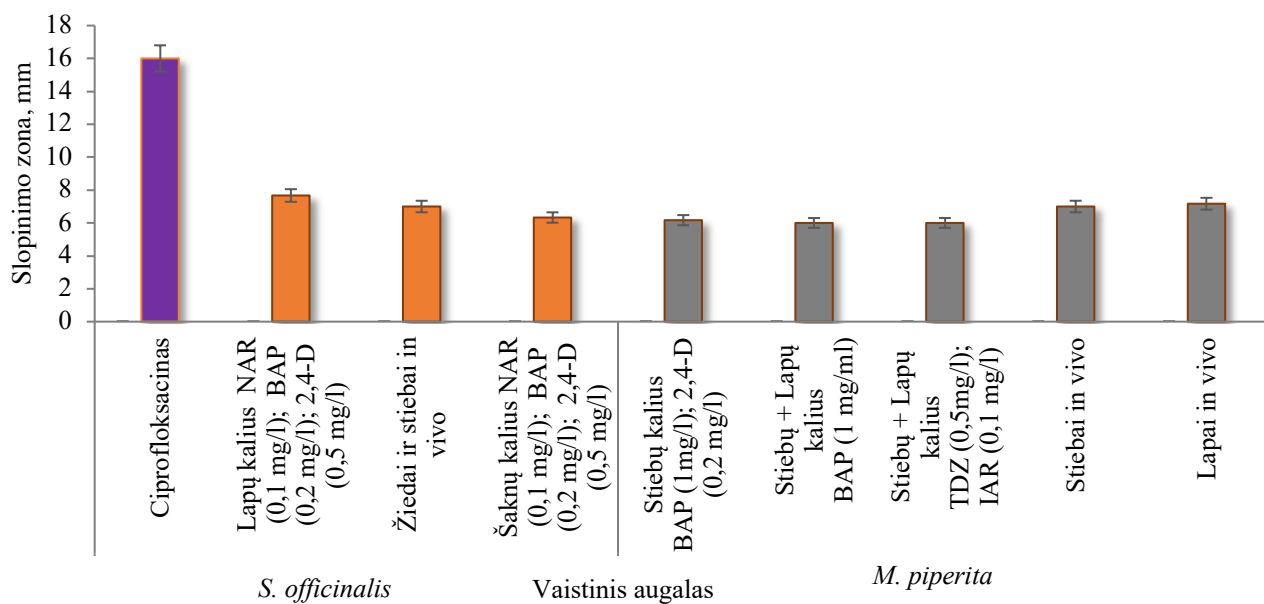
3.33 pav. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas *S. officinalis* ir *M. piperita* ekstraktuose

Gauti rezultatai parodė (žr. 3.33 pav.), kad prolindehidrogenazės didesnis aktyvumas pastebėtas šalavijo nei pipirmėtės augalų ekstraktuose. Šalavijo lapų ekstraktuose šio fermento aktyvumas siekė 770,47 $\mu\text{mol NAD/mg}$, o tai yra dvigubai daugiau nei pipirmėtės ar kituose augalo dalių ekstraktuose. Mažesnis aktyvumas buvo šalavijo žiedų ir stiebų mišinio *in vivo* ekstrakto – 328,00 $\mu\text{mol NAD/mg}$. Mažiausi prolindehidrogenazės aktyvumai fiksuoti pipirmėtės *in vivo* kultūrų, stiebų – 62,121 $\mu\text{mol NAD/mg}$ ir lapų 44,359 $\mu\text{mol NAD/mg}$ ekstraktuose.

Gauti fermentinių tyrimų rezultatai sutampa su Sharafzadeh ir kt. [176] pastebėjusių, kad analizuotų antioksidacinių fermentų aktyvumas *S. officinalis* ir *Mentha piperita*, buvo didesnis augaluose augintuose mitybinėse terpėse su augimo reguliatoriais. Autoriai įrodė, kad citokinino naudojimas paskatina eterinio aliejaus kaupimąsi dėl tiesioginio poveikio monoterpenoidų metabolizmui.

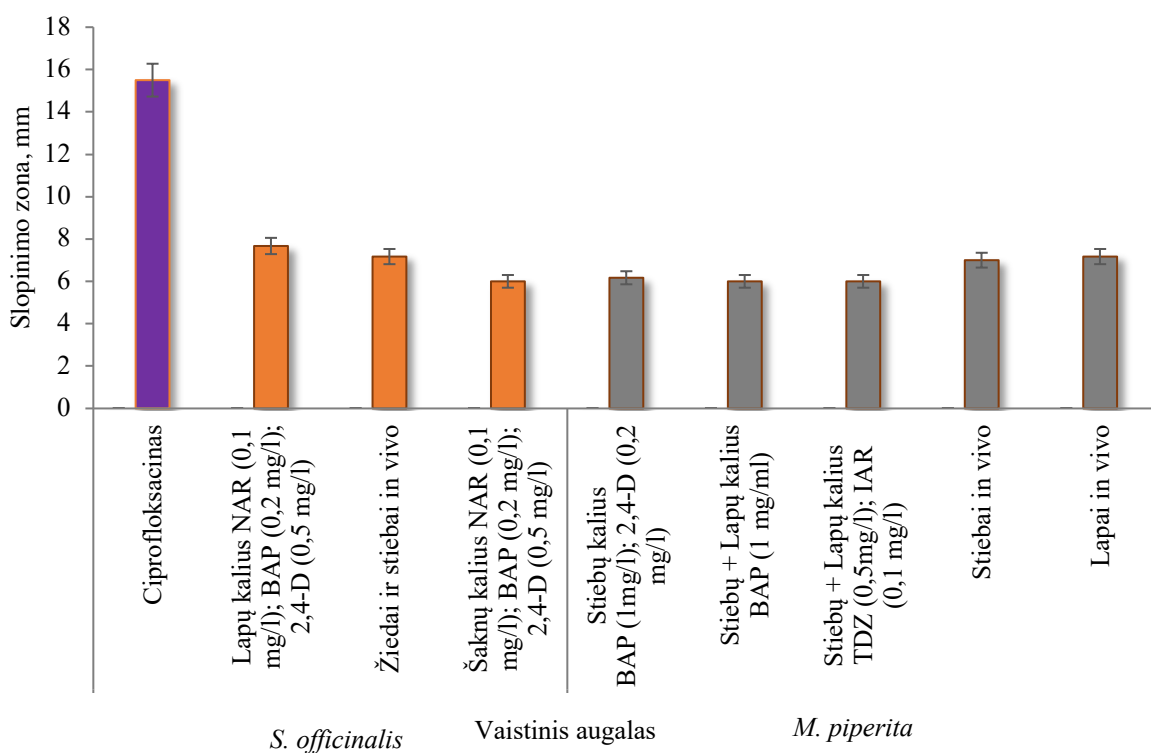
3.4. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas

3.4.1. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinį įvertinimas prieš *Xanthomonas campestris*; *Rhizobium radiobacter* bakterijas



3.34 pav. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *Xanthomonas campestris* bakterijas

Tyrimų rezultatai atskleidė (žr. 3.34 pav.), kad stipriausią antibakterinį poveikį atskleidė tiriamųjų vaistinių augalų lapų ekstraktai. Šalavijo lapų kaliaus ekstrakto slopinimo zona prieš *Xanthomonas campestris* buvo 7,67 mm, o pipirmėtės lapų *in vivo* ekstrakto – 7,17 mm. Antibiotikas ciprofloksacinas (16,00 mm) bakterijas *X. campestris* slopino dvigubai intensyviau nei augaliniai ekstraktai. Tokia pati didelė slopinimo zona buvo šalavijo žiedų ir stiebų mišinio *in vitro* bei šalavijų stiebų *in vivo* ekstraktų – 7 mm. Silpniausias antibakterinis poveikis rastas pipirmėtės stiebų ir lapų, augintų MS terpėje su BAP ir TDZ; IAR, ekstrakto – 6,00 mm.



3.35 pav. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *Rhizobium radiobacter* bakterijas

Tyrimų rezultatai (žr. 3.35 pav.) parodė, kad šalavijo lapų kaliaus ekstraktas iš tiriamųjų augalų pasižymėjo didžiausia slopinimo zona – 7,67 mm. Vaistinių augalų lapų ekstraktas *Rhizobium radiobacter* slopino taip pat kaip *X. campestris*, slopinimo zonos siekė 7,17 mm. Šalavijo šaknų kaliaus ir pipirmėtės stiebų ir lapų mišinio kaliaus, augintų MS terpėje su BAP ir TZD; IAR, slopinimo zonos buvo – 6,00 mm.

Tyrėjai įrodo, kad *S. officinalis* ir *M. piperita* yra veiksmingi prieš gramneigiamas ir gramteigiamas bakterijas. Ghezelbash ir kt. [147] darbe šalavijo etanolio ir acetono ekstraktai parodė slopinimo zonas prieš gramteigiamas – *S. aureus*, *B. anthracis*, *B. cereus*, taip pat prieš gramneigiamas bakterijas – *E. coli*. Tarp kurių tyrimai parodė, kad gramneigiami mikroorganizmai buvo jautresni ekstraktams nei mūsų ir slopinimo zonos siekė (7–11 mm).

Pipirmėtės ekstrakto gramneigiamų bakterijų slopinimo zonos kinta platesniame diapazone nei mūsų bandinių – nuo 5,1 iki 12,4 mm. Tyrėjai nustatė, kad ekstraktas efektyvesnis prieš gramteigiamus organizmus, lyginant su gramneigiamais [169].

Rekomendacijos

Daugelį vertingų bioaktyvių metabolitų galima išgauti iš *S. officinalis* ir *M. piperita* augalų *in vitro* kultūrų. Dabartiniai rezultatai rodo, kad augimo reguliatorių naudojimas teigiamai veikia kaliaus kultūras padidinant bioaktyvių junginių gamybą. *S. officinalis* NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l) ir *M. piperita* BAP (1mg/l) ir BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l) kultūrose augimo reguliatorių naudojimas reikšmingai padidino karotinoidų, baltymų, koncentracijas, redukcinį bei antioksidacinių fermentų aktyvumą *in vitro*.

Pastebėta, kad *S. officinalis* lapų ir *M. piperita* lapų bei stiebų ekstraktai turi reikšmingų antioksidacinių savybių galinčių padėti pašalinti laisvuosius radikalus ir reaktyvias molekules, dalyvaujančias daugelyje fiziologinių procesų susijusių su rimtomis ligomis, tokiomis kaip širdies ir kraujagyslių ligos, vėžys, priešlaikinis senėjimas. Šie vaistiniai augalai taip pat pasižymi ir antimikrobinio potencialu prieš gramneigiamas bakterijas. Tačiau reikalingi tolesni antimikrobinio, antioksidacinio aktyvumo, skirtingų antioksidacinių mechanizmų ir antrinių metabolitų tyrimai.

Ateityje siekiant įtvirtinti vaistinio šalavijo ir pipirmėtės komercinį antrinių metabolitų gamybos potencialą ir išnaudoti antioksidacines, antimikrobines savybes, rekomenduotina:

- atlikti tyrimus su didesnių koncentracijų ir įvairesniais augimo reguliatoriais, siekiant maksimalios bioaktyvių junginių gamybos bei atlikti papildomus tyrimus, kad būtų patvirtintas šių koncentracijų augimo reguliatorių saugumas vartoti žmonėms;
- išbandyti žaliąsias ekstrahavimo technikas, nes šios gali turėti reikšmingą poveikį bioaktyviųjų junginių kiekiui;
- pasirenkant optimalius ekstraktus atlikti intralastelinius antioksidacinio aktyvumo tyrimus (su ląstelių kultūromis);
- prieš tyrimus identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti vaistinius augalus aukšto slėgio skysčių chromatografijos metodu siekiant išsiaiškinti kokie augalo junginiai gali turėti didžiausią įtaką antioksidacinėms ir antimikrobinėms savybėms;
- atlikti bandymus su gramteigiamomis bakterijomis;
- antrinių metabolitų koncentracijas didinti sukuriant racionalias metabolizmų kelių strategijas bendradarbiaujant su biochemijos inžinerijos, farmakognozijos, molekulinės biologijos ekspertais.

Išvados

1. Antioksidacinių tyrimų rezultatai parodė, kad tiek vaistiniui šalavijui (lot. *Salvia officinalis* L.), tiek pipirmėtei (lot. *Mentha piperita* L.) būdingas antioksidacinis aktyvumas. Efektyvesniu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo šalavijo lapų kaliaus kultūrų *in vitro*, augintų ant MS terpės su NAR (0,1 mg/l), BAP (0,2 mg/l) ir 2,4-D (0,5 mg/l), o pipirmėtės lapų ir stiebų kaliaus kultūrų, augintų ant MS terpės su BAP (1 mg/l), ekstraktai.
2. Antioksidacinių tyrimų rezultatai siejosi tarpusavyje su fenolinių junginių koncentracija augaluose. Didžiausios šių junginių koncentracijos rastos vaistinio šalavijo lapų kaliaus kultūrų, augintų ant MS terpės su NAR (0,1 mg/l), BAP (0,2 mg/l) ir 2,4-D (0,5 mg/l) ir pipirmėtės lapų ir stiebų kaliaus kultūrose, augintose MS terpėje su BAP (1 mg/l), ekstraktuose.
3. Didžiausios askorbo rūgšties, chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų, aminorūgščių koncentracijos aptiktos šalavijo lapų ekstrakto. Didžiausios baltymų, fenolinių rūgščių koncentracijos buvo pipirmėtės stiebų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su BAP (1 mg/l), 2,4-D (0,2 mg/l), ekstrakto. Didžiausia antocianinų koncentracija rasta 39,058 mg/100g *M. piperita* lapų *in vivo* ekstrakto.
4. Įvertinus antioksidacinius fermentus šalavijo (lot. *Salvia officinalis* L.) ir pipirmėtės (lot. *Mentha piperita* L.) ekstraktuose stipriausias superoksido dismutazės, prolindehidrogenazės aktyvumas fiksuotas šalavijo kaliaus kultūrų *in vitro* iš lapų ekstraktuose, o oksidacinio streso biomarkerio malondialdehido koncentracija - šalavijo šaknų kaliuje *in vitro*.
5. Nustačius vaistinių augalų antibakterinį aktyvumą prieš *Rhizobium radiobacter* ir *Xanthomonas campestris*, šalavijo lapų kaliaus ekstraktas iš tiriamųjų augalų pasižymėjo didžiausia slopinimo zona – 7,67 mm, tačiau nebuvo toks efektyvus, lyginant su antibiotiku ciprofloksacinu –16 mm. Iš tirtų šalavijo ir pipirmėtės ekstraktų, daugumoje tyrimų efektyviausias buvo šalavijo lapų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su NAR (0,1 mg/l), BAP (0,2 mg/l) ir 2,4-D (0,5 mg/l), o pipirmėtės – *M. piperita* stiebų ir lapų kaliaus kultūrų, augintų MS terpėje su BAP (1 mg/l), ekstraktai.

Literatūros sąrašas

1. SRIVASTAV, V.K., C. EGBUNA, M. TIWARI. Chapter 1 - Plant secondary metabolites as lead compounds for the production of potent drugs. In: EGBUNA, C. ir kt. *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*. Amsterdam: Elsevier, 2020, pp. 3-14, ISBN 9780128178904.
2. JAMWAL, K., S. BHATTACHARYA, S. PURI. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, t. 9, nr.1, 2018, p.p 26-38. ISSN 2214-7861.
3. CIANCIULLO, P., V. MARESCA, S. SORBO, A. BASILE. Antioxidant and Antibacterial Properties of Extracts and Bioactive Compounds in Bryophytes. *Applied Sciences*. 2022, t. 12, nr. 1, pp.160.DOI: 10.3390/app12010160
4. ERST, A.A., ir kt. Optimization of Biomass Accumulation and Production of Phenolic Compounds in Callus Cultures of *Rhodiola rosea* L. Using Design of Experiments. *Plants (Basel)*. 2022, t. 11, nr.1, pp. 124. DOI: 10.3390/plants11010124.
5. DINÇ, M., N.M PINAR, S. DOGU, S. YILDIRIMLI. Micromorphological studies of *Lallemantia l.* (Lamiaceae) species growing in Turkey. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. 2009, , t. 51, nr. 1, pp. 45-54. ISSN: 0001-5296.
6. GLISIC, S., J. IVANOVIC, M. RISTIC, D. SKALA. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2010, , t. 52, nr. 1, pp. 62-70. ISSN 0896-8446.
7. YASHASWINI S., J. FAGAN, J. SCHAEFER. Ethnobotany, phytochemistry, cultivation and medicinal properties of Garden sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2019; t. 8, nr. 3, pp. 3139-3148. ISSN: 2349-8234.
8. MARTINA, Grdiša ir kt. Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2015, t. 80, nr. 2, pp. 69-78. ISSN: 1993-7749.
9. ALTINDAL, Demet., Nüket ALTINDAL. Chapter 81 - Sage (*Salvia officinalis*) Oils. In: PREEDY Victor R. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Cambridge: Academic Press, 2016, pp. 715-721. ISBN 9780124166417.
10. KOKKINI S., R. KAROUSOU, E. HANLIDOU. HERBS | Herbs of the Labiatae. In: BENJAMIN Caballero. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* .2nd. Cambridge: Academic Press, 2003, pp. 3082-3090. ISBN 9780122270550.
11. WILSON L., Spices and Flavoring Crops: Leaf and Floral Structures. In: BENJAMIN Caballero, Paul M. FINGLAS, Fidel TOLDRÁ. *Encyclopedia of Food and Health*. Cambridge: Academic Press, 2016, pp: 84-92. ISBN 9780123849533.
12. JANULIS, Valdimaras, Genė PUODŽIŪNIENĖ, Zita BARSTEIGIENĖ. Morfologiniai ir anatominiai vaistinių augalinių žaliavų požymiai : mokomoji knyga [interaktyvus]. Kaunas, 2001. [žiūrėta 2022-03-21]. Prieiga per: <https://hdl.handle.net/20.500.12512/70780>.
13. MÜHLBAUER Werner., Joachim MÜLLER. Chapter 10.6 - Sage (*Salvia officinalis* L.). In: MÜHLBAUER Werner, Joachim MÜLLER. *Drying Atlas*, Cambridge: Woodhead Publishing, 2020, pp. 401-407. ISBN 9780128181621.
14. MAFAKHERI, Mohammad, Mojtaba KORDROSTAMI. Chapter 23 - Recent advances toward exploiting medicinal plants as phytoremediators. In: HASANUZZAMAN Mirza., Majeti

- NARASIMHA, Vara PRASAD. *Handbook of Bioremediation*. Cambridge: Academic Press, 2021, pp. 371-383. ISBN 9780128193822.
15. SHARIFI-RAD, Mehdi ir kt. *Salvia* spp. plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, t. 80, nr.1, pp. 242-263. ISSN 0924-2244.
 16. DADASIEWICZ, K., A. OKOŃ, S. OCIEPA, T. KRÓL. Morphological and genetic diversity among peppermint (*Mentha × piperita* L.) cultivars. *Acta Scientiarum Poonorum Hortorum Cultus*. 2017, t. 16, nr.3, pp.151-161. ISSN 1644-0692.
 17. PUSHANGADAN, P., S.K. TEWARI. 28 - Peppermint. In: PETER, K.V. *In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Handbook of Herbs and Spices*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006, pp. 460-481. ISBN 9781845690175.
 18. SINGH, R., A. M. MUFTAH, A. BELKHEIR. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, t. 8, nr. 3, pp. 322-328, ISSN 1878-5352.
 19. ABBASZADEH, B., S. ALIREZA-VALADABADI, H. ALIABADI-FARAHANI, H.HASANPOUR-DARVISHI. Studying of essential oil variations in leaves of *Mentha* species. *African Journal of Plant Science*. 2009, t. 3 nr.10, pp. 217-221. ISSN 1996-0824.
 20. WILSON, L. Spices and Flavoring Crops: Leaf and Floral Structures. In: CABALLERO Benjamin, P. M. FINGLAS, F. TOLDRÁ. *Encyclopedia of Food and Health*. Cambridge: Academic Press, 2016, pp. 84-92. ISBN 9780123849533.
 21. FAYED, Marwa. MENTHA PIPERITA L. -a promising dental care herb mainly against cariogenic bacteria. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*. 2019, t. 4, nr.3 pp.33-38. ISSN: 2456-8058.
 22. PAUL R., D. ANIMESH. An updated overview on peppermint (*Mentha piperita* L.). *International. Research. Journal of Pharmacy*. 2011, t. 2 nr. 8 pp. 1-10. ISSN 2230-8407
 23. MAURÍCIO L. ir kt. Chapter 4 - Antiparasitic agents, In: KIBENGE S.B., B. BALDISSEROTTO, R. SIE-MAEN CHONG. *Aquaculture Pharmacology*. Cambridge: Academic Press, 2021, pp. 169-217. ISBN 9780128213391.
 24. MUNTEAN, D ir kt. Evaluation of essential oil obtained from *Mentha×piperita* L. against multidrug-resistant strains. *Infection Drug Resistance*. 2019, t.12, nr.1, pp. 2905-2914. ISSN 1178-6973.
 25. SALEHI, B ir kt. Plants of Genus *Mentha*: From Farm to Food Factory. *Plants*. 2018, t.7 nr.3, pp.70. ISSN 2223-7747.
 26. WU, T., S. M. KERBLER, A. R. FERNIE, Y. ZHANG. Plant cell cultures as heterologous bio-factories for secondary metabolite production. *Plant Communications*. 2021, t. 2, nr. 5, pp. 100-235. ISSN 2590-3462.
 27. EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*. 2019, t. 5, nr.1, pp. 50-59. ISSN 2095-8099.
 28. SAURABH, Bhatia. Chapter 2 - Plant Tissue Culture. In: SAURABH, Bhatia., K. SHARMA, R. DAHIYA, T. BERA. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Cambridge:Academic Press, 2015, pp. 31-107. ISBN 9780128022214.
 29. SRIVASTAVA, Priyanka., M. SINGH, G. DEVI, R. CHATURVEDI. Chapter 30 - Herbal Medicine and Biotechnology for the Benefit of Human Health. In: VERMA Ashish S., A. SINGH. *Animal Biotechnology*. Cambridge: Academic Press, 2014, pp. 563-575. ISBN 9780124160026.

30. KHAN T, M.A. KHAN, K. KARAM, N. ULLAH, Z.U. MASHWANI, A. NADHMAN. Plant *in vitro* Culture Technologies; A Promise Into Factories of Secondary Metabolites Against COVID-19. *Frontiers in Plant Science*. 2021, t.12, nr.1, pp. 610-694. doi: 10.3389/fpls.2021.610194.
- 31.
32. RAHIM, M.H.A., E. J. LIM, H. HASAN, A. ABBAS. The investigation of media components for optimal metabolite production of *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *Journal of Microbiological Methods*. 2019, t. 164, nr.1, pp. 105-672. ISSN 0167-7012.
33. . SUNGHUN, Park. Chapter 3 - Media components and preparation. In: SUNGHUN Park. *Plant Tissue Culture*. 4th. Cambridge: Academic Press, 2021, t.1, pp. 33-45, ISBN 9780128211205.
34. NASUTION, N., I. WAHIDAH. The Effect Of Plant Growth Regulators On Callus Induction Of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019, t. 305, nr. 1. pp:012-049. DOI: 10.1088/1755-1315/305/1/012049.
35. SRIVASTAVA, Lalit M. Chapter 8 - Cytokinins. In: SRIVASTAVA, Lalit M. *Plant Growth and Development*. Cambridge: Academic Press, 2002, pp. 191-204, ISBN 9780126605709.
36. JAMWAL, K., S. BHATTACHARYA, S. PURI. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2018, t. 9, nr.1, pp. 26-38, ISSN 2214-7861.
37. CONSTABEL, F., J. P. SHYLUK. Initiation, Nutrition and Maintenance of Plant Cell and Tissue Culture. In: VASIL, A., T. A. THORPE. *Plant Cell and Tissue Culture*. Dordrech: Springer, 1994, pp. 3-15. ISBN 978-0-7923-2493-5
38. FEJÉR, J., D. GRUĽOVÁ, V. De FEO, E. ÜRGEOVÁ, B. OBERT, A. PREŤOVÁ. *Mentha* × *piperita* L. nodal segments cultures and their essential oil production. *Industrial Crops and Products*. 2018, t.112, nr.1, pp. 550-555. ISSN 0926-6690.
39. SANTOS-GOMES, P. C., R. M SEABRA, P. B. ANDRADE, M. FERNANDES-FERREIRA. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.), *Plant Science*. 2002, t. 162, nr. 6, pp. 981-987, ISSN 0168-9452.
40. AVATO, P., I. M. FORTUNATO, Cl. RUTA, R. D'ELIA. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science*. 2005, t. 169, nr. 1, pp. 29-36. ISSN 0168-9452.
41. DURAN, R.E., Y. COSKUN, A. S. TULGAR, M. ALTUNCU, Y. KOPARAL. *In vitro* callus induction and rosmarinic acid accumulation of *Salvia officinalis*. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013, t. 24, nr. 1, pp. S118. ISSN 0958-1669.
42. NGO, Y.L., C. H. LAU, L. S. CHUA. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, t. 121, nr.1, pp. 687-700. ISSN 0278-6915.
43. JOKIĆ, S., M. MOLNAR, M. JAKOVLJEVIĆ, K. ALADIĆ, I. JERKOVIĆ. Optimization of supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. leaves targeted on Oxygenated monoterpenes, α-humulene, viridiflorol and manool. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2018, t. 133, nr. 1, pp. 253-262. ISSN 0896-8446.
44. JURIC, T., N. MIĆIĆ, A. POTKONJAK, D. MILANOV, J. DODIĆ, Z. TRIVUNOVIĆ, B.M. POPOVIĆ, The evaluation of phenolic content, *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of *Mentha piperita* extracts obtained by natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*. 2021, t. 362, nr.1, pp. 130-226. ISSN 0308-8146.

45. SKALICKA-WOŹNIAK, K., M. WALASEK. Preparative separation of menthol and pulegone from peppermint oil (*Mentha piperita* L.) by high-performance counter-current chromatography. *Phytochemistry Letters*. 2014, t. 10, nr. 1, pp. 94-98. ISSN 1874-3900.
46. BHATIA, S., R. DAHIYA. Chapter 4 - Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science. In: BHATIA, S., R. DAHIYA. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Cambridge: Academic Press, 2015, pp. 121-156. ISBN 9780128022214.
47. BONG, F.J ir kt. The development of callus and cell suspension cultures of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus nutans*) for the production of flavonoids and phenolics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2021, t. 33, nr.1, pp. 101-977. ISSN 1878-8181.
48. KHAN, T., B. H. ABBASI, M. A. KHAN, M. AZEEM. Production of biomass and useful compounds through elicitation in adventitious root cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*. 2017, t. 108, nr.1, pp. 451-457. ISSN 0926-6690.
49. KHAN, M.A ir kt. Iron nano modulated growth and biosynthesis of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Plant Cell Tissue Organic Culture*. 2020. t. 143, nr.1, pp. 121–130. ISSN 0167-6857.
50. GONÇALVES, S., A. ROMANO. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2013 Volume 31, Issue 2, 2013, Pages 166-174, ISSN 0734-9750.
51. VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2012, t. 3, nr.4, pp. 200-201. ISSN: 2231-4040
52. ALAMGIR, A.N.M. Phytoconstituents—Active and Inert Constituents, Metabolic Pathways, Chemistry and Application of Phytoconstituents, Primary Metabolic Products, and Bioactive Compounds of Primary Metabolic Origin. In: *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts. Progress in Drug Research*. 2-oji laida. Denmark: Springer Cham, 2018, t. 74. ISBN: 978-3-319-92386-4.
53. ASHUTOSH, K. *Pharmacognosy And Pharmacobiotechnology*. 2-oji laida. United Kingdom: Anshan Publishers, 2008. ISBN-13978-1905740734.
54. MUSTAFA, M., A. OMAR, K. SURYA, M.N.J.ABDULKADIR. Study of some *Salvia Officinalis* L. (SAGE) components and effect of their aqueous extract on antioxidant. *International Journal Chemistry Science*. 2016, t.14, nr.2, pp. 711-719. ISSN 0972-768X
55. HUSSEIN, R., A. EL-ANSSARY. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In *Herbal Medicine. IntechOpen*. 2018, t.1, nr.1, pp.11-27. DOI: 10.5772/intechopen.76139
56. DUPLAIS, C., N. PAPON, V. COURDAVAULT. Tracking the Origin and Evolution of Plant Metabolites. *Trends in Plant Science*. 2020, t. 25, nr. 12, pp. 1182-1184, ISSN 1360-1385.
57. LI, Y., D. KONG, Y. FU, M. R. SUSSMAN, H. WU. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020, t.148, nr.1, pp.80-89. ISSN 0981-9428.
58. WU, T., S. M. KERBLER, A. R. FERNIE, Y. ZHANG. Plant cell cultures as heterologous bio-factories for secondary metabolite production. *Plant Communications*. 2021, t. 2, nr. 5, pp. 100-235. ISSN 2590-3462.
59. ZAYNAB, Madiha ir kt. Role of primary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2019, t.137, nr.1, pp. 103-728, ISSN 0882-4010.
60. ADETUNJI Oluwaseun. C ir kt. Chapter 1 - General principle of primary and secondary plant metabolites: Biogenesis, metabolism, and extraction In: CHUKWUEBUKA, E., A. P. MISHRA,

- R. M. GOYAL. *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders*. Cambridge: Academic Press, 2021, pp.3-23. ISBN 9780128202845.
61. ZEECE, Michael. Chapter Eight - Food colorants. In: . ZEECE, Michael. *Introduction to the Chemistry of Food*. Cambridge: Academic Press, 2020, pp. 313-344. ISBN 9780128094341.
 62. PAGELS, Fernando ir kt. Chapter 18 - Pigments from microalgae, In: JACOB-LOPES,E., M. M. MARONEZe, M. I. QUEIROZ, L. Q. ZEPKA. *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Cambridge: Academic Press, 2020, pp. 465-492, ISBN 9780128185360.
 63. NISAR, N., L. LI, S. LU, N. C. KHIN, B. J. POGSON. Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*. 2015, t. 8, nr.1, pp. 68-82. ISSN 1674-2052
 64. MANDAL, M.K., N. K. CHANU, N. CHAURASIA. Chapter 5 - Cyanobacterial pigments and their fluorescence characteristics: applications in research and industry. In: SINGH, P.K., A. KUMAR, V. K. SINGH, A. K. SHRIVASTAVA. *Advances in Cyanobacterial Biology*. Cambridge: Academic Press, 2020, pp. 55-72, ISBN 9780128193112.
 65. CARVALHO, L., C. A. NUNES. Smartphone-based method for the determination of chlorophyll and carotenoid contents in olive and avocado oils: An approach with calibration transfer. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2021, t.104, nr.1, pp.104-164. ISSN 0889-1575.
 66. BERK, Zeki. Chapter 2 - Morphology and chemical composition. In: BERK, Zeki. *Citrus Fruit Processing*. Cambridge: Academic Press, 2016, pp. 9-54, ISBN 9780128031339.
 67. SMIRNOFF, N., G.L. WHEELER. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. Critical Review. *Biochemistry Molecular Biology*. 2000, t.35, nr.4, pp.291-314. DOI: 10.1080/10409230008984166.
 68. LOEWUS, F.A. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*. 1999, t. 52, nr. 2, pp. 193-210. ISSN 0031-9422.
 69. SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018, t. 122, nr. 1, pp. 116-129. ISSN 0891-5849.
 70. MARIO, F., A. IRAIDA, V. VICTORIANO, B. MIGUEL. Vitamin C Content in Fruits: Biosynthesis and Regulation. *Frontiers in Plant Science*. 2019, t. 9. nr. 1, pp.62-64. ISSN: 1664-462X.
 71. Mittu, B., Z. R. BHAT, A. CHAUHAN, J. KOUR, A. BEHERA, M. KAUR. Chapter 16 - Ascorbic acid. In: KOUR, J., G. A. NAYIK. *Nutraceuticals and Health Care*. Cambridge: Academic Press, 2022, pp. 289-302, ISBN 9780323897792.
 72. SMIRNOFF, N. Chapter 4 - Vitamin C: The Metabolism and Functions of Ascorbic Acid in Plants. In: RÉBEILLÉ, F., R. DOUCE. *Advances in Botanical Research*. Cambridge: Academic Press, 2011, t. 59, pp. 107-177. ISBN 9780123858535.
 73. HÄUSLER, E.R., F. LUDEWIG, S. KRUEGER. Amino acids – A life between metabolism and signaling. *PLANT SCIENCE*. 2014, t. 229, nr.1, pp. 225-237. ISSN 0168-9452.
 74. ZEIER, J. Amino acid metabolism and plant immunity. *Plant Cell Environment*. 2013, t. 36, nr.12, pp. 2085-2103. DOI: 10.1111/pce.12122.
 75. KUMAR, Vinod ir kt. Amino acids distribution in economical important plants: a review. *Biotechnology Research and Innovation*. 2019, t. 3, nr. 2, pp. 197-207. ISSN 2452-0721.
 76. HILDEBRANDT, T.M., A. N. NESI, W. L. ARAÚJO, H.P. BRAUN. Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant*. 2015, t. 8, nr. 11, pp. 1563-1579. ISSN 1674-2052.

77. PARTHASARATHY, A., E. J. BORREGO, M. A. SAVKA, R. C.J. DOBSON, A. O. HUDSON. Amino acid–derived defense metabolites from plants: A potential source to facilitate novel antimicrobial development. *Journal of Biological Chemistry*. 2021, t. 296, nr.1, pp.100-438. ISSN 0021-9258.
78. BIELECKA, M., G. CICHOSZ, H. CZECZOT. Antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities of bovine milk proteins and their hydrolysates - A review. *International Dairy Journal*. 2022, t. 127, nr.1, pp. 105-208. ISSN 0958-6946.
79. REJEB K. B., C. ABDELLY , A. SAVOURÉ. La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales [Proline, a multifunctional amino-acid involved in plant adaptation to environmental constraints]. *Biologie Aujourd'hui*. 2012, t. 206, nr. 4, pp. 291-299. DOI: 10.1051/jbio/2012030.
80. ALVAREZ, M.E., A. SAVOURÉ, L. SZABADOS. Proline metabolism as regulatory hub. *Trends in Plant Science*. 2022, t. 27, nr. 1, pp. 39-55. ISSN 1360-1385.
81. ALIA, J., M.B. BHAVESH, P. MOHANTY. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*. 2022, t. 82, nr.1, pp. 525-532. ISSN 0011-3891.
82. SZABADOS, L., A. SAVOURÉ. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 2010, t. 15, nr. 2, pp. 89-97. ISSN 1360-1385.
83. DICKMAN, M.B, D.F. BECKER. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Biology Medicine*. 2008 t. 44, nr. 4, pp. 671-81. ISSN 0891-5849.
84. KUTCHAN, T. M.; J. Gershenzon, B.L. MOLLER, D.R. Gang. Natural Products. In: KUTCHAN, T. M. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2-oji laida. Blackwell: Wiley, 2015; pp 1132–1206. ISBN 978-0-470-71421-8.
85. SRIVASTAV, V.K., C. EGBUNA, M. TIWARI. Chapter 1 - Plant secondary metabolites as lead compounds for the production of potent drugs. In: EGBUNA, C . *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*. Netherlands: Elsevier, 2020, pp. 3-14. ISBN 9780128178904.
86. Zaynab, Madiha ir kt. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2018, t. 124, nr.1, pp. 198-202. ISSN 0882 4010.
87. FUMIHIKO, Sato, 2.26 - Plant Alkaloid Engineering. In: HUNG-WEN L., P.T . BEGLEY. *Comprehensive Natural Products*. 3-oji laida. Netherlands: Elsevier, 2020, pp. 700-755. ISBN 9780081026915.
88. ROSA. L.A., J. O. MORENO-ESCAMILLA, J. RODRIGO-GARCÍA, E. ALVAREZ-PARRILLA. Chapter 12 - Phenolic Compounds. In: YAHIA, E. M. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019, pp. 253-271. ISBN 9780128132784.
89. AYAD, R., S. AKKAL. Chapter 12 - Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera. In: ATTA-UR-RAHMAN. *Studies in Natural Products Chemistry*. Cambridge: Elsevier, 2019, t. 63, pp. 357-414, ISBN 9780128179017.
90. SANTOS-BUELGA, C., A. M. GONZÁLEZ-PARAMÁS. Anthocyanins. In: MELTON, L., F. SHAHIDI, P. VARELIS. *Encyclopedia of Food Chemistry*. Cambridge: Academic Press, 2019, pp. 10-21. ISBN 9780128140451.

91. REN-YOU, Gan, . 9 - Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. In: FENG, H., B. NEMZER, J. W. DEVRIES. *Sprouted Grains, AACC*. Somerville: International Press, 2019, pp. 191-246. ISBN 9780128115251.
92. LATTANZIO, V. V.M.T LATTANZINO, A. CARDINALI. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: IMPERATO, F. *Phytochemistry: advances in research*. Trivandrum: Research Signpost, 2006. t. 661. pp. 23-67. ISBN 8130800349.
93. ROBY, M.H.H., M. A. SARHAN, K. A.H. SELIM, K. I. KHALEL. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 2013, t. 43, nr.1, pp. 827-831. ISSN 0926-6690.
94. LU, Y., L.Y. FOO. Polyphenolics of *Salvia*--a review. *Phytochemistry*. 2002 t. 59, nr.2, pp. 117-40. DOI: 10.1016/s0031-9422(01)00415-0.
95. SANTOS-BUELGA, C., A. M. GONZÁLEZ-PARAMÁS. Anthocyanins. In: MELTON, L., F. SHAHIDI, P. VARELIS. *Encyclopedia of Food Chemistry*. Cambridge: Academic Press, 2019, pp. 10-21, ISBN 9780128140451.
96. WONG-PAZ, J.E ir kt. 5 - Extraction of Bioactive Phenolic Compounds by Alternative Technologies. In: GRUMEZESCU, A.M., A. M. HOLBAN. *In Handbook of Food Bioengineering, Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*. Cambridge: Academic Press, 2017, pp. 229-252. ISBN 9780128115213.
97. BUCKLE, Jane . Chapter 3 - Basic Plant Taxonomy, Basic Essential Oil Chemistry, Extraction, Biosynthesis, and Analysis. In: BUCKLE, Jane. *Clinical Aromatherapy*. 3-oji laida.London: Churchill Livingstone, 2015, pp. 37-72. ISBN 9780702054402.
98. ULLAH, H., H. KHAN. Chapter 16 - Epigenetic drug development for autoimmune and inflammatory diseases. In: CASTELO-BRANCO,P., C. JERONIMO. *In Translational Epigenetics, Histone Modifications in Therapy*. Cambridge: Academic Press, 2020, pp. 395-413. ISBN 9780128164228.
99. SOLTANI, J. Chapter 22 - Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus*: Recent Advances. In : GUPTA, V.K. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Netherlands: Elsevier, 2016, pp. 275-292. ISBN: 9780444635051.
100. THOLL D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In: SCHRADER J., J. BOHLMANN. *Biotechnology of Isoprenoids. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Denmark:Springer, Cham, 2015, t.148. ISBN: 978-3-319-20106-1
101. HAYOUNI, El Akrem ir kt. *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, t. 125, nr. 3, pp. 242-251. ISSN 0168-1605.
102. JOKIĆ, S., M. MOLNAR, M. JAKOVLJEVIĆ, K. ALADIĆ, I. JERKOVIĆ. Optimization of supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. leaves targeted on Oxygenated monoterpenes, α -humulene, viridiflorol and manool. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2018, t. 133, nr.1, pp. 253-262. ISSN 0896-8446.
103. EL-NAKHLAWY, F., M. Shaheen, A. AL-SHAREEF. Response of Essential Oil and Terpene Contents of Two Mint Genotypes to Different Drying Temperatures before Distillation. *Journal of Agricultural Science*. 2013, t. 5., nr.12, pp. 1-7. ISSN 1916-9752

104. BANSAL, Tanu. Benefits of essential oil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2016, t.8, nr.6, pp.143-149. ISSN 0975-7384.
105. BARTNIK, M., P.C. FACEY. Chapter 8 - Glycosides. In: BADAL, Simone. *Rupika Delgoda, Pharmacognosy*. Cambridge: Academic Press, 2017, pp. 101-161. ISBN 9780128021040.
106. YU, B., J. SUN, X, YANG. Assembly of naturally occurring glycosides, evolved tactics, and glycosylation methods. *Accounts of Chemical Research*.2012, t. 45, nr.8 ,pp. 1227-1236. ISSN: 00014842.
107. GLEADOW, R.M, B.L. MØLLER. Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. *Annul Review Plant Biology*. 2014; t.65, nr.1, pp. 155-185. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040027.
108. BHATTACHARYA, Amitav. Chapter 5 - High-Temperature Stress and Metabolism of Secondary Metabolites in Plants. In: BHATTACHARYA, Amitav. *Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules*. Cambridge: Academic Press, 2019, pp. 391-484. ISBN 9780128175620.
109. ONAOLAPO, A.Y., O.J. ONAOLAPO, 9 - Herbal Beverages and Brain Function in Health and Disease. In: GRUMEZESCU, A.M., A. M. HOLBAN. *Functional and Medicinal Beverages*. Cambridge: Academic Press, 2019, pp. 313-349. ISBN 9780128163979.
110. GHORBANI, A., M. ESMAEILIZADEH. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2017, t. 7, nr. 4, pp. 433-440. ISSN 2225-4110.
111. INOUE, T., Y. SUGIMOTO, H. MASUDA , C, KAMEI. Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 2002, t. 25, nr.2. pp. 256-259. ISSN: 0918-6158.
112. ARES, A.M., J. L. BERNAL, M. J. NOZAL, J. BERNAL. Chapter 6 - Analysis of herbal bioactives. In: GALANAKIS, C.M. *Aromatic Herbs in Food*. Cambridge: Academic Press, 2021, pp. 201-232. ISBN 9780128227169.
113. TOHIDI,M., M. RAHIMMALEK, H, TRINDADE. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. *Industrial Crops and Products*. 2019, t.134, nr.1, pp. 89-99. ISSN 0926-6690.
114. IRITI, M., G. COLNAGHI, F. CHEMAT, J. SMADJA, F. FAORO, F. VISINONi. Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study. *Flavour and Fragrance Journal*.2006, t. 21, nr.1, pp. 704-712. ISSN 0882-5734.
115. SANKARIKUTTY, B., C.S. NARAYANAN. Essential oils | Isolation and Production. In: CABALLERO, Benjamin. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2-oji laida. Cambridge: Academic Press, 2003, pp. 2185-2189. ISBN 9780122270550.
116. BUTNARIU, M., I. SARAC. Essential Oils from Plants . *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*. 2018, t. 1, nr.4, pp. 35-43. ISSN : 2576-6694
117. STRATAKOS, A.C., A. KOIDIS. Chapter 4 - Methods for Extracting Essential Oils. In: PREEDY, V.R. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Cambridge: Academic Press, 2016, pp. 31-38. ISBN 9780124166417.
118. BADIEE, P., A.R. NASIRZADEH, M. MOTAFFAF. Comparison of *Salvia officinalis* L. essential oil and antifungal agents against candida species. *Journal of. Pharmaceutical Technology and Drug Research*, 2012, t.1, nr.7, pp.1-7. ISSN 2050-120X.

119. VOSOUGHI, Najmeh ir kt. Essential oil composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies. *Industrial Crops and Products*. 2018, t.117, nr.1, pp. 366-374. ISSN 0926-6690.
120. SINGH, P., A.K. PANDEY. Prospective of Essential Oils of the Genus *Mentha* as Biopesticides: A Review. *Frontiers in Plant Science*. 2018 ; t.9, nr.1, pp:1295. ISSN 1664-462X.
121. TANEJA, S.C., S. CHANDRA, 20 - Mint. In: : PETER, K.V .*Food Science, Technology and Nutrition, Handbook of Herbs and Spices*. 2-oji laida. Cambridge:Woodhead Publishing, 2012, pp. 366-387. ISBN 9780857090393.
122. KELLY, F.J., J. C. FUSSELL. Role of oxidative stress in cardiovascular disease outcomes following exposure to ambient air pollution. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017, t. 110, nr.1, pp. 345-367. ISSN 0891-5849.
123. MWANGI, R.W., J. M. MACHARIA, I. N. WAGARA, R. L. BENICE. The antioxidant potential of different edible and medicinal mushrooms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022, t. 147, nr.1, pp. 112-621. ISSN 0753-3322.
124. SUN, Yu ir kt. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. *Redox Biology*. 2020, t. 37, nr.1, pp. 101-696. ISSN 2213-2317.
125. RAY, P.D., B.W. HUANG, Y. TSUJI. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*. 2012, t. 24, nr. 5, pp. 981-990. ISSN 0898-6568.
126. KHAN, Q. Abdul ir kt. Reactive oxygen species (ROS) in cancer pathogenesis and therapy: An update on the role of ROS in anticancer action of benzophenanthridine alkaloids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021, t. 143, nr.1, pp. 112-142. ISSN 0753-3322.
127. SLIKA, Hasan ir kt. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022, t. 146,nr.1 ,pp. 112-442. ISSN 0753-3322.
128. MAYA-CANO,D.A., S. ARANGO-VARELA, G. A. SANTA-GONZALEZ. Phenolic compounds of blueberries (*Vaccinium* spp) as a protective strategy against skin cell damage induced by ROS: A review of antioxidant potential and antiproliferative capacity.*Heliyon*. 2021, t.7, nr. 2, pp. e06297. ISSN 2405-8440.
129. GARCIA, C., C. N. BLESSO. Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021, t. 172, nr.1, pp. 152-166. ISSN 0891-5849.
130. RODRÍGUEZ-ARCE, E., M. SALDÍAS. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021, t. 143, nr.1, pp. 112-236. ISSN 0753-3322.
131. SOUZA, R.F.V., W. F. GIOVANI. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 2004, t. 9, nr. 2 ,pp. 97-104. ISSN: 1351-0002.
132. SAMSONOWICZ, M., E. REGULSKA, M. KALINOWSKA. Hydroxyflavone metal complexes - molecular structure, antioxidant activity and biological effects. *Chemico-Biological Interaction*. 2017, t. 273, nr.1, pp. 245-256. ISSN 0009 2797.

133. KHAN, I.T. ir kt . Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids Health and Disease*. 2019, t. 18, nr. 1, pp. 41. DOI: 10.1186/s12944-019-0969-8.
134. EL EUCH, S.K., D.B. HASSINE, S. CAZAUX, N. BOUZOUITA, J. BOUJILA. Salvia officinalis essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities. *South African Journal of Botany*. 2019, t.120, nr.1, pp. 253-260. ISSN 0254-6299.
135. LU, Y., L.Y. FOO. Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from Salvia officinalis. *Tetrahedron Letters*. 2001, t. 42, nr. 46, pp. 8223-8225. ISSN 0040-4039.
136. FRANCIK S. ir kt. Identification of Phenolic Compounds and Determination of Antioxidant Activity in Extracts and Infusions of Salvia Leaves. *Materials (Basel)*. 2020, t. 13, nr.24, pp. 5811. ISSN: 33352787.
137. ABDELKADER, M., B. AHCEN, D. RACHID, H. HAKIM. Phytochemical Study and Biological Activity of Sage (Salvia officinalis L.). International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural. *Food and Biotechnological Engineering*. 2014, t. 8, nr.11, pp. 1231-1235. ISNI:0000000091950263.
138. YU, M. ir kt. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Science Report*. 2021, t. 11, nr.1., pp. 10041. DOI:10.1038/s41598-021-89437-4.
139. SINGH, R., A.M. MUFTAH, A. BELKHEIR. Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, t. 8, nr. 3, pp. 322-328. ISSN 1878-5352.
140. BENABDALLAH, A., M. BOUMENDJEL, O. AISSI, C. RAHMOUNE, M. BOUSSAID, C. MESSAOUD. Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild Mentha species from northeastern Algeria. *South African Journal of Botany*. 2018, t.116, nr.1, pp. 131-139. ISSN 0254-6299.
141. KAUR,P., N. MEHTA, O.P. MALAV, M.K. CHATLI, H. PANWAR. Antimicrobial, antioxidant and antibiofilm potential of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil for application in meat products. *Journal of Animal Research*. 2020, t. 10, nr.1, pp: 33-40. DOI: 10.30954/2277-940X.01.2020.4
142. BALDELLI, Alberto ir kt. Antimicrobial properties of spray-dried cellulose nanocrystals and metal oxide-based nanoparticles-in-microspheres. *Chemical Engineering Journal Advances*. 2022, t. 10, nr.1, pp. 100273. ISSN 2666-8211.
143. CETIN-KARACA, H., M. C. NEWMAN. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli. *Food Bioscience*. 2015, t. 11, nr.1, pp. 8-16. ISSN 2212-4292.
144. LIMA, L.M., B. N. M. da SILVA, G. BARBOSA, E. J. BARREIRO. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, t. 208, nr.1 , pp.1-48. ISSN 0223-5234.
145. SATMI, F.R.S., M. A. HOSSAIN. In vitro antimicrobial potential of crude extracts and chemical compositions of essential oils of leaves of Mentha piperita L native to the Sultanate of Oman. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*. 2016, t. 18, nr. 2, pp. 103-106. ISSN 2405-8823.
146. SINGH, R., A.M. MUFTAH, A.B. SHUSHNI. Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita L. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, t. 8, nr.3, pp. 322-328. ISSN 1878-5352.

147. YAZGAN, Hatice. Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. *LWT*. 2020, t. 130, nr.1, pp. 109-669. ISSN 0023-6438.
148. GHEZELBASH GH.R., M.R. PARISHANI, M.H. FOUANI. Antimicrobial activity of salvia officinalis acetone extract against pathogenic isolates. *Journal of herbal drugs*. 2015, t. 5, nr.4, pp.215-218. ISSN: 2476-5392.
149. ASKARI, S.F., R. AVAN, Z. TAYARANI-NAJARAN, A. SAHEBKAR, S. EGHBALI. Iranian Salvia species: A phytochemical and pharmacological update. *Phytochemistry*.2021, t. 183, nr.1, pp. 112619. ISSN 0031-9422.
150. HASANEIN, P., Z. FELEHGARI, A. EMAMJOMEH. Preventive effects of Salvia officinalis L. against learning and memory deficit induced by diabetes in rats: Possible hypoglycaemic and antioxidant mechanisms. *Neuroscience Letters*. 2016, t. 622, nr.1, pp. 72-77. ISSN 0304-3940.
151. EIDI, M., A. EIDI, M. BAHAR. Effects of Salvia officinalis L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. *Nutrition*. t. 22, nr. 3, pp. 321-326. ISSN 0899-9007.
152. FERREIRA, J., S. SANTOS, H. PEREIRA. *In Vitro* Screening for Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of *Quercus suber* Cork and Corkback Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020, t.1, pp. 1-8. DOI: 10.1155/2020/3825629
153. HASANEIN, P., M. SHARIFI, A. EMAMJOMEH. Recent Studies on the Neuropharmacological Effects of Salvia officinalis L.: A Promising Candidate for Alzheimer's Disease. *Medicinal Chemistry*. *Medicine Chemistry*. 2017, t.7, nr.11, pp. 348-352. ISSN: 2161-0444.
154. FERREIRA, A., C. PROENÇA , M.L. SERRALHEIRO, M.E. ARAÚJO . The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, t.108, nr.1, pp. 31-7. DOI: 10.1016/j.jep.2006.04.010.
155. EIDI, A., M. EIDI. Antidiabetic effects of sage (Salvia officinalis L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, Diabetes & Metabolic Syndrome. *Clinical Research & Reviews*. 2009, t. 3, nr. 1, pp. 40-44. ISSN 1871-4021.
156. SHEHADEH, M. B., A.R.Y.G. SUAIFAN, A.M. ABU-ODEH. Plants Secondary Metabolites as Blood Glucose-Lowering Molecules. *Molecules*. 2021, t. 26, nr.14, pp. 4333. ISSN 1420-3049.
157. DIMPFEL W., D.G.N. Chiegoua, S. BOMMER. Effectiveness of Menosan® Salvia officinalis in the treatment of a wide spectrum of menopausal complaints. A double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Heliyon*. 2021, t. 7, nr. 2, pp. 05910, ISSN 2405-8440.
158. RODRIGUES, Melissa Raboni Alves. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of Salvia officinalis in mice, *Journal of Ethnopharmacology*. 2012, t. 139, nr. 2, pp. 519-526, ISSN 0378-8741.
159. HANAWAY, Patrick J. Chapter 41 - Irritable Bowel Syndrome, In: RAKEL, David. *Integrative Medicine*. 4-oji laida. Netherlands: Elsevier, 2018, pp. 423-432. ISBN 9780323358682
160. LOOLAIE, Adibi. Peppermint and Its Functionality: A Review. *Archives of clinical Microbiology*. 2017, t. 8, nr. 4:54, pp. 1-16. ISSN 1989-8436
161. WEERTS, Z.Z.R.M. Efficacy and Safety of Peppermint Oil in a Randomized, Double-Blind Trial of Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2020, t. 158, nr. 1, pp. 123-136. ISSN 0016-5085.

162. ROMM, Aviva ir kt. CHAPTER 5 - Menstrual Wellness and Menstrual Problems. In: ROMM, A., L. M. HARDY, S. MILLS. *Botanical Medicine for Women's Health*. Churchill Livingstone, 2010, pp. 97-185. ISBN 9780443072772.
163. ABDELLATIEF, S.A., R. R. BEHEIRY, S. A.M. EL-MANDRAWY. Peppermint essential oil alleviates hyperglycemia caused by streptozotocin- nicotinamide-induced type 2 diabetes in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017, t. 95, nr.1, pp. 990-999. ISSN 0753-3322.
164. KEHILI, S., M. BOUKHATEM, A. BELKADI, M. FERHAT, W. SETZER. Peppermint (*Mentha Piperita* L.) Essential Oil As a Potent Anti-Inflammatory, Wound Healing and Anti-Nociceptive Drug. *European Journal of Biological Research*. 2020,t. 10, nr.1, pp. 132-149. ISSN 2449-8955 .
165. BRAHMI, F ir kt. Evidence of biological activity of *Mentha* species extracts on apoptotic and autophagic targets on murine RAW264.7 and human U937 monocytic cells. *Pharmacology. Biology*. 2017, t. 55,nr.1, pp. 286–293. ISSN: 1388-0209.
166. MAGHAMI, Mahla., M. R. AFAZEL, I. AZIZI-FINI, M. MAGHAMI. The effect of aromatherapy with peppermint essential oil on nausea and vomiting after cardiac surgery: A randomized clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2020, t. 40, nr.1, pp. 101-199. ISSN 1744-3881.
167. SCHUHMACHER, A., J. REICHLING, P. SCHNITZLER. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine*. 2003, t. 10, nr. 6–7, pp. 504-510. ISSN 0944-7113.
168. HASSAN, A., F. MERVAT, M. AL-MOGHAZY. Assessment of the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts on the Shelf Life of Mayonnaise. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 2012, t.7, nr.1, pp. 28-40. ISSN: 1817-308X.
169. GRZEGORCZYK, A., H. MATKOWSKI. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*. 2007, t.104, nr. 2, pp. 536-541.ISSN 0308-8146.
170. VIEIRA, S.F., H. FERREIRA, N.M. NEVES. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Cytocompatible *Salvia officinalis* Extracts: A Comparison between Traditional and Soxhlet Extraction. *Antioxidants (Basel)*. 2020, t. 9, nr. 11, pp.1157. DOI: 10.3390/antiox9111157.
171. HEMMATI, N., M. CHENIANY, A. GANJEALI. Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge. *Botanica Serbica*. 2020, t. 44, nr.1, pp. 163-173. ISSN : 1664-462X.
172. CHOUKAIRI, Z., T. HAZZAZ, J. M. FERRANDEZ, F. TAOUFIQ. The cytotoxic activity of *Salvia officinalis* L. and *Rosmarinus officinalis* L. Leaves extracts on human glioblastoma cell line and their antioxidant effect. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*.2020, t.17, nr.4, pp. 80-89. DOI: 10.1515/jcim-2018-0189.
173. MAHFUZ, E., I. TELCI, A. HÜSEYİN, E. RAMAZAN. Comparison of total phenolic contents and antioxidant capacities in mint genotypes used as spices / Baharat olarak kullanılan nane genotiplerinin toplam fenolik içerikleri ve antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2015, t. 40, nr.6, pp. 456-462. DOI: 10.1515/tjb-2015-0034.
174. GARCIA-MIER, Lina ir kt. Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Stevia and Peppermint as a Result of Organic and Conventional Fertilization. *Journal of Food Quality*. 2021, t.28, nr.1, pp.1-6. .ISSN: 0146-9428.
175. ŠIĆ ŽLABUR, J., S. VOĆA, N. DOBRIČEVIĆ, S. PLIESTIĆ, A. GALIĆ, A. BORIČEVIĆ, N. BORIĆ. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from lemon balm and

- peppermint leaves. *International Agrophysics*. 2016, t.30, nr.1, pp. 25-31 DOI: 10.1515/intag-2015-0077.
176. BREZOIU, Ana-Maria ir kt. Properties of *Salvia officinalis* L. and *Thymus serpyllum* L. Extracts Free and Embedded into Mesopores of Silica and Titania Nanomaterials. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 2020, t.10, nr.5, pp.820. DOI:10.3390/nano10050820 .
177. SHARAFZADEH, S., M. ZARE. Influence of Growth Regulators on Growth and Secondary Metabolites of Some Medicinal Plants from Lamiaceae Family. *Advances in Environmental Biology*. 2011, t. 5, nr.8, pp. 2296-2302. ISSN 1995-0756 .

Priedai

1 priedas. Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

Eil.Nr	Žaliava	515 nm (1)	515 nm (2)	515 nm (3)	Vidurkis	%slopinimas
0	Palyginamasis tirpalas	0,681	0,689	0,614	0,661	-
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,035	0,033	0,032	0,033	95,007
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,161	0,165	0,158	0,161	75,642
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,148	0,148	0,145	0,147	77,760
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,109	0,075	0,069	0,084	87,292
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,075	0,075	0,068	0,073	88,956
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,094	0,097	0,101	0,097	85,325
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,085	0,087	0,088	0,087	86,838
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,080	0,081	0,081	0,084	87,292
9	Askorbo r.	0,016	0,019	0,018	0,017	97,428
10	Butilintas hidroksitoluenas	0,010	0,018	0,019	0,019	97,126

2 priedas. Tiriamųjų augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu su skiedimais.

Eil. Nr.	Žaliava	515 nm (1)	515 nm (2)	515 nm (3)	Vidurkis	% slopinimas
0	Kontrolė	0,722	0,729	0,751	0,734	-
1	Šalavijas lapai <i>in vivo</i> 0,1 g/ml	0,047	0,043	0,044	0,044	94,005
2	Šalavijas lapai <i>in vivo</i> 0,05 g/ml	0,050	0,046	0,047	0,048	93,460
3	Šalavijas lapai <i>in vivo</i> 0,025 g/ml	0,049	0,050	0,049	0,049	93,324
4	Šalavijas lapai <i>in vivo</i> 0,0125 g/ml	0,177	0,167	0,165	0,169	76,975
5	Šalavijas žiedai ir stiebai <i>in vivo</i> 0,1 g/ml	0,049	0,054	0,053	0,052	92,916
6	Šalavijas žiedai ir stiebai <i>in vivo</i> 0,05 g/ml	0,226	0,192	0,178	0,199	72,888
7	Šalavijas žiedai ir stiebai <i>in vivo</i> 0,025 g/ml	0,448	0,463	0,437	0,449	38,828
8	Šalavijas žiedai ir stiebai <i>in vivo</i> 0,0125 g/ml	0,616	0,591	0,612	0,606	17,439

Eil.N r.	Žaliava	515 nm (1)	515 nm (2)	515 nm (3)	Vidurkis	% slopinimas
1	Pipirmetė stiebai <i>kaliaus</i> BAP 1mg/l 2,4-D 0,1 g/ml	0,020	0,028	0,021	0,023	96,867
2	Pipirmetė stiebai <i>kaliaus</i> BAP 1mg/l 2,4-D 0,05g/ml	0,037	0,036	0,036	0,036	95,096
3	Pipirmetė stiebai <i>kaliaus</i> BAP 1mg/l 2,4-D 0,025 g/ml	0,081	0,052	0,050	0,061	91,690
4	Pipirmetė stiebai <i>kaliaus</i> BAP 1mg/l 2,4-D 0,0125 g/ml	0,144	0,134	0,127	0,135	81,608
5	Pipirmetė stiebai + lapai <i>kaliaus</i> BAP 1 mg/ml 0,1 g/ml	0,032	0,035	0,035	0,034	95,368
6	Pipirmetė stiebai + lapai <i>kaliaus</i> BAP 1 mg/ml 0,05 g/ml	0,038	0,037	0,037	0,037	94,960
7	Pipirmetė stiebai + lapai <i>kaliaus</i> BAP 1 mg/ml 0,025 g/ml	0,218	0,209	0,199	0,209	71,526
8	Pipirmetė stiebai + lapai <i>kaliaus</i> BAP 1 mg/ml 0,0125 g/ml	0,391	0,388	0,383	0,387	47,275
9	Pipirmetė stiebai + lapai TDZ 0,5 IAR 0,1 <i>kaliaus</i> 0,1 g/ml	0,030	0,032	0,032	0,031	95,777
10	Pipirmetė stiebai + lapai TDZ 0,5 IAR 0,1 <i>kaliaus</i> 0,05 g/ml	0,048	0,037	0,036	0,040	94,550
11	Pipirmetė stiebai + lapai TDZ 0,5 IAR 0,1 <i>kaliaus</i> 0,025 g/ml	0,083	0,111	0,087	0,094	87,193
12	Pipirmetė stiebai + lapai TDZ 0,5 IAR 0,1 <i>kaliaus</i> 0,0125g/ml	0,193	0,186	0,167	0,182	75,204
13	Pipirmetė stiebai <i>in vivo</i> 0,1 g/ml	0,030	0,034	0,023	0,029	96,049
14	Pipirmetė stiebai <i>in vivo</i> 0,05 g/ml	0,194	0,187	0,176	0,186	74,659
15	Pipirmetė stiebai <i>in vivo</i> 0,025 g/ml	0,370	0,363	0,349	0,361	50,817
16	Pipirmetė stiebai <i>in vivo</i> 0,0125 g/ml	0,495	0,488	0,483	0,489	33,379
17	Pipirmetė lapai <i>in vivo</i> 0,1 g/ ml	0,035	0,035	0,034	0,035	95,232
18	Pipirmetė lapai <i>in vivo</i> 0,05 g/ ml	0,039	0,038	0,037	0,038	94,822
19	Pipirmetė lapai <i>in vivo</i> 0,025 g/ ml	0,139	0,121	0,110	0,123	83,243
20	Pipirmetė lapai <i>in vivo</i> 0,0125 g/ ml	0,376	0,382	0,370	0,376	48,774

3 priedas. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-triplitidil-s-triaziną.

Eil. Nr.	Žaliava	593 nm (1)	593 nm (2)	593 nm (3)	Vidurkis	konc $\mu\text{mol/L}$
----------	---------	------------	------------	------------	----------	------------------------

1	Šalavijo lapų kilius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	1,529	1,328	1,425	1,427	345,390
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,307	0,370	0,371	0,349	82,463
3	Šalavijo šaknų kilius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,561	0,568	0,574	0,568	135,878
4	Pipirmėtės stiebų kilius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	1,569	1,754	1,771	1,698	411,487
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kilius BAP (1 mg/ml)	1,605	1,681	1,748	1,678	406,610
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kilius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	1,247	1,318	1,339	1,301	314,659
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,436	0,596	0,555	0,529	126,366
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	1,220	1,320	1,324	1,288	311,488
9	Askorbo r.	2,090	2,124	2,126	2,113	512,708
10	Butilintas hidroksitoluenas	0,910	0,990	0,966	0,955	230,268

4 priedas. Antioksidacinis aktyvumas augaluose pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-triptidil-s-triaziną su skiedimais.

Eil. Nr.	Žaliava	593 nm (1)	593 nm (2)	593 nm (3)	Vidurkis	konc $\mu\text{mol/L}$
1	Šalavijo lapų kilius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,341	0,372	0,391	0,368	87,096
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,044	0,061	0,067	0,057	11,244
3	Šalavijo šaknų kilius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,125	0,122	0,118	0,121	26,854
4	Pipirmėtės stiebų kilius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,524	0,506	0,588	0,539	128,805
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kilius BAP (1 mg/ml)	0,421	0,390	0,475	0,429	101,976
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kilius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,279	0,264	0,271	0,271	63,439
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,101	0,097	0,122	0,107	23,439
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,243	0,179	0,252	0,225	52,219
9	Askorbo rūgštis	2,113	2,060	2,096	2,090	507,098
10	Butilintas hidroksitoluenas	0,728	0,712	0,710	0,717	172,219

5 priedas. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose.

Eil. Nr.	Žaliava	700 nm (1)	700 nm (2)	700 nm (3)	Vidurkis
1	Šalavijo lapų kilius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	1,172	1,193	1,179	1,181
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,374	0,400	0,389	0,388

3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,597	0,596	0,533	0,575
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	1,148	0,824	0,979	0,984
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,996	1,005	1,003	1,001
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,950	1,011	0,980	0,980
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,500	0,463	0,516	0,493
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,834	0,860	0,852	0,849
9	Askorbo rūgštis	3,317	3,294	3,299	3,303
10	Butilintas hidroksitoluenas	2,485	2,535	2,434	2,485

6 priedas. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augaluose su skiedimais.

Eil. Nr.	Žaliava	700 nm (1)	700 nm (2)	700 nm (3)	Vidurkis
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,580	0,578	0,595	0,584
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,188	0,140	0,198	0,175
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,233	0,251	0,239	0,241
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,359	0,375	0,369	0,368
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,367	0,386	0,378	0,377
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,296	0,305	0,311	0,304
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,151	0,153	0,159	0,154
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,237	0,336	0,248	0,274
9	Askorbo rūgštis	2,131	2,189	2,181	2,167
10	Butilintas hidroksitoluenas	2,109	2,131	2,104	2,115

7 priedas. Vaistinis augalų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu.

Eil. Nr.	Žaliava	734 nm (1)	734 nm (2)	734 nm (3)	Vidurkis	% slopinimas
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,013	0,009	0,008	0,010	99,278
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,025	0,016	0,023	0,021	98,485
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,034	0,036	0,031	0,034	97,546

4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,018	0,021	0,019	0,019	98,629
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,017	0,020	0,015	0,017	98,773
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,028	0,022	0,027	0,026	98,124
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,042	0,035	0,034	0,037	97,330
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,025	0,020	0,022	0,022	98,413

8 priedas. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas Folino-Kiokalto.

Eil. Nr.	Žaliava	725 nm (1)	725 nm (2)	725 nm (3)	Vidurkis	a; µg	Bendra fenolinių junginių koncentracija mg/100mg
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,462	0,463	0,457	0,461	4,761	3,174
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,247	0,271	0,249	0,156	1,554	1,518
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,281	0,205	0,284	0,190	1,912	1,637
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,442	0,413	0,435	0,430	4,435	2,957
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,442	0,440	0,440	0,441	4,551	3,034
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,314	0,328	0,322	0,321	3,289	2,193
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,164	0,161	0,148	0,158	1,575	1,050
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,394	0,390	0,399	0,394	4,057	2,705

Eil. Nr.	Tanino rūgšties pradinio tirpalo tūris, µl	Iki 500 µl skiesto tirpalo koncentracija µg/ml	Šviesos sugertis, kai bangos ilgis 725 nm
1	10	0,5	0,051
2	20	1,0	0,115
3	30	1,5	0,154
4	40	2,0	0,203
5	50	2,5	0,252
6	60	3,0	0,274
7	70	3,5	0,340
8	80	4,0	0,402
9	90	4,5	0,439
10	100	5,0	0,474
11	110	5,5	0,527
12	120	6,0	0,591
13	130	6,5	0,619

9 priedas. Flavonoidų koncentracijos įvertinimas

Eil. Nr.	Žaliava	415 nm (1)	415 nm (2)	415 nm (3)	Vidurkis	c ₁ mg/ml	Flavonoidų koncentracija pagal kvercetiną mg/g
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	3,12 4	3,1 46	3,1 46	3,139	55,573	0,556
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	1,38 2	1,3 01	1,3 79	1,354	23,000	0,230
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,47 6	0,4 92	0,4 90	0,486	7,161	0,072
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	1,12 5	1,1 54	1,1 51	1,143	19,150	0,192
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	2,33 2	2,4 91	2,4 86	2,436	42,745	0,427
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	1,66 6	1,9 97	1,6 62	1,775	30,682	0,307
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,97 0	0,9 13	0,9 66	0,950	15,627	0,156
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	1,97 3	2,0 65	2,0 67	2,035	35,427	0,354

Paruošto kvercetino koncentracija, mg/l	415 nm (1)	415 nm (2)	415 nm (3)	Vidurkis
10	0,669	0,740	0,673	0,694
20	1,262	1,277	1,269	1,269
30	1,726	1,763	1,730	1,740
40	2,319	2,236	2,329	2,295
50	2,661	2,833	2,844	2,779

10 priedas. Bendras fenolinių rūgščių koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje.

Eil. Nr.	Žaliava	490 nm (1)	490 nm (2)	490 nm (3)	Vidurkis	Fenolinių rūgščių konc %
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	2,786	2,818	2,796	2,8	49,12
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,473	0,460	0,471	0,47	8,24

3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,100	0,116	0,111	0,11	1,92
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	2,146	2,095	2,131	2,12	37,19
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	1,416	1,384	1,381	1,39	24,39
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,49	0,482	0,488	0,49	8,59
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,801	0,874	0,873	0,85	14,91
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	1,738	1,697	1,696	1,71	30,00

11 priedas. Chlorofilo *a* koncentracijos įvertinimas augaluose.

Eil. Nr.	Žaliava	662 nm (1)	662 nm (2)	662 nm (3)	Vidurkis	a konc	b konc	C _a + C _b
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,470	0,468	0,467	0,468	4,366	2,430	6,796
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,068	0,066	0,065	0,066	0,601	0,657	1,258
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,066	0,066	0,068	0,067	0,615	0,567	1,182
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,107	0,106	0,103	0,105	0,931	1,590	2,521
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,219	0,220	0,222	0,220	1,998	2,319	4,317
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,199	0,196	0,198	0,198	1,814	1,736	3,551
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,170	0,169	0,167	0,169	1,539	1,678	3,218
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,153	0,152	0,158	0,154	1,424	1,084	2,507

12 priedas. Chlorofilo *b* koncentracijos įvertinimas augaluose

Eil. Nr.	Žaliava	644 nm (1)	644 nm (2)	644 nm (3)	Vidurkis	a konc	b konc	C _a + C _b
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,212	0,215	0,217	0,215	4,366	2,430	6,796
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,044	0,048	0,044	0,045	0,601	0,657	1,258
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,046	0,040	0,036	0,041	0,615	0,567	1,182

4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,093	0,097	0,101	0,097	0,931	1,590	2,521
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,156	0,154	0,158	0,156	1,998	2,319	4,317
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,125	0,124	0,124	0,124	1,814	1,736	3,551
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,113	0,117	0,116	0,115	1,539	1,678	3,218
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,086	0,083	0,082	0,084	1,424	1,084	2,507

13 priedas. Chlorofilo karotinoidų koncentracijos įvertinimas augaluose

Eil. Nr.	Žaliava	441 nm (1)	441 nm (2)	441 nm (3)	Vidurkis	Karotino idų konc mg l ⁻¹	Pigment ū koncentracija mg/100g
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,530	0,529	0,530	0,530	0,667	6,337
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,083	0,082	0,085	0,083	0,053	0,498
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,094	0,110	0,112	0,105	0,176	1,672
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,162	0,161	0,161	0,161	0,080	0,725
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,28	0,278	0,279	0,279	0,358	3,3652
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,301	0,308	0,314	0,308	0,289	2,629
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,198	0,195	0,196	0,196	0,058	0,532
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,198	0,199	0,198	0,198	0,257	2,313

14 priedas. Liuteino koncentracijos įvertinimas augaluose.

Eil. Nr.	Žaliava	446 nm (1)	446 nm (2)	446 nm (3)	Vidurkis	Liuteino koncentracija mg/g
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,492	0,491	0,492	0,492	0,097
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,209	0,207	0,206	0,207	0,041
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,190	0,189	0,187	0,189	0,037
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,156	0,155	0,156	0,156	0,031
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,277	0,278	0,273	0,276	0,053

6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,261	0,269	0,261	0,264	0,052
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,184	0,182	0,185	0,184	0,036
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,275	0,274	0,275	0,275	0,054

15 priedas. Bendrosios antocianinų koncentracijos įvertinimas augaluose.

pH 1

Eil. Nr.	Žaliava	510 nm (1)	510 nm (2)	510 nm (3)	Vidurkis	A	BAK
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,331	0,339	0,341	0,337	0,078	32,410
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,317	0,303	0,301	0,307	0,086	35,734
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,120	0,119	0,116	0,118	0,015	6,233
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,159	0,157	0,153	0,156	0,004	1,662
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,180	0,185	0,188	0,184	0,022	10,158
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,169	0,165	0,166	0,167	0,009	3,739
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,165	0,172	0,163	0,167	0,076	31,578
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,188	0,184	0,186	0,186	0,094	39,058

pH 4,5;

Eil.Nr.	Žaliava	510 nm (1)	510 nm (2)	510 nm (3)	Vidurkis
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,209	0,208	0,211	0,209
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,170	1,161	0,154	0,495
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,098	0,102	0,108	0,102
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,176	0,173	0,169	0,173
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,156	0,157	0,152	0,155
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,148	0,148	0,149	0,148
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,091	0,088	0,080	0,086
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,087	0,084	0,082	0,084

pH 1;

Eil. Nr.	Žaliava	700 nm (1)	700 nm (2)	700 nm (3)	Vidurkis
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,131	0,129	0,130	0,130
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,152	0,148	0,142	0,147
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,045	0,033	0,035	0,037
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,042	0,042	0,040	0,041
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,071	0,073	0,062	0,068
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,069	0,071	0,069	0,070
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,043	0,031	0,032	0,035
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,031	0,040	0,043	0,038

pH 4,5;

Eil.Nr.	Žaliava	700 nm (1)	700 nm (2)	700 nm (3)	Vidurkis
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,078	0,079	0,077	0,08
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,085	0,086	0,082	0,08
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,037	0,036	0,037	0,036
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,062	0,061	0,057	0,06
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,061	0,063	0,059	0,061
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,058	0,056	0,056	0,06
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,026	0,025	0,027	0,03
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,035	0,033	0,036	0,03

16 priedas. Askorbo rūgšties kiekybinis įvertinimas

Eil.Nr.	Žaliava	(x1) µl	(x2) µl	(x3) µl	Vidurkis µl	C koncentracija 100 gramų mg%
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	160	120	160	146,667	64,680

2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	80	40	40	53,333	23,320
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	40	40	40	40,000	17,600
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	60	60	60	60,000	26,400
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	80	80	40	66,667	29,333
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	80	60	80	73,333	32,267
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	40	40	60	46,667	20,533
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	80	120	100	100,000	44,000

17 priedas. Baltymų koncentracijos įvertinimas augalinėje žaliavoje.

Kontrolė su natrio acetatu

Eil. Nr.	Žaliava	595 nm (1)	595 nm (2)	595 nm (3)	Vidurkis	a	Bendra baltymų koncentracija X(mg/100mg)
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,851	0,826	0,803	0,827	0,106	0,212
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,542	0,539	0,536	0,539	0,068	0,136
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,710	0,703	0,701	0,704	0,089	0,178
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,883	0,848	0,834	0,855	0,109	0,218
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,760	0,745	0,721	0,742	0,094	0,188
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,749	0,713	0,700	0,721	0,092	0,184
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,561	0,550	0,540	0,550	0,069	0,138
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,733	0,713	0,677	0,708	0,090	0,180

Kontrolė su boratu

Eil. Nr.	Žaliava	595 nm (1)	595 nm (2)	595 nm (3)	Vidurkis	a	Bendra baltymų koncentracija X(mg/100mg)
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	1,011	1,004	0,980	0,998	0,128	0,256
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,839	0,840	0,839	0,839	0,107	0,214

3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,854	0,831	0,848	0,844	0,108	0,216
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	1,185	1,153	1,119	1,152	0,148	0,296
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	1,128	1,122	1,091	1,114	0,143	0,286
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	1,226	1,214	1,194	1,211	0,155	0,310
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,936	0,937	0,912	0,928	0,119	0,238
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,966	0,947	0,921	0,945	0,121	0,242

18 priedas. L-prolino koncentracijos įvertinimas.

Eil. Nr.	Žaliava	520 nm (1)	520 nm (2)	520 nm (3)	Vidurkis	k μmol	C _x μmol/g
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,995	0,989	0,999	0,994	96,848	3850,676
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,312	0,274	0,279	0,288	28,576	329,196
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,155	0,165	0,156	0,159	16,101	102,402
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,518	0,508	0,509	0,512	50,237	1028,854
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,519	0,535	0,532	0,529	51,881	1097,802
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,441	0,483	0,436	0,453	44,531	806,902
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,342	0,340	0,322	0,335	33,121	443,821
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,910	0,899	0,891	0,900	87,757	3159,252

L - prolino koncentracija, mM	520 nm (1)	520 nm (2)	520 nm (3)	Vidurkis
0,025	0,208	0,248	0,206	0,221
0,05	0,491	0,490	0,486	0,489
0,075	0,711	0,810	0,759	0,760
0,1	1,029	1,109	1,067	1,068
0,125	1,346	1,398	1,371	1,372
0,15	1,354	1,508	1,666	1,509
0,175	1,797	1,756	1,728	1,760

19 priedas. Malondialdehido (MDA) koncentracijos nustatymas.

Eil. Nr.	Žaliava	532 nm (1)	532 nm (2)	532 nm (3)	Vidurkis	MDA koncentracija μmol/g

1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,304	0,300	0,301	0,302	0,135
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,523	0,521	0,522	0,522	0,226
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	1,145	1,126	1,151	1,141	0,636
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,457	0,473	0,465	0,465	0,192
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,493	0,480	0,463	0,479	0,197
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,688	0,683	0,682	0,684	0,270
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,974	0,799	0,976	0,916	0,375
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,618	0,595	0,607	0,607	0,283

Eil. Nr.	Žaliava	600 nm (1)	600 nm (2)	600 nm (3)	Vidurkis	MDA koncentracija $\mu\text{mol/g}$
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,091	0,094	0,092	0,092	0,135
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,178	0,160	0,168	0,169	0,226
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,154	0,136	0,158	0,149	0,636
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,170	0,162	0,165	0,166	0,192
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,156	0,188	0,172	0,172	0,197
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,260	0,251	0,278	0,263	0,270
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,331	0,316	0,346	0,331	0,375
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,171	0,160	0,165	0,165	0,283

20 priedas. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimas

Eil.Nr.	Žaliava	595 nm (1)	595 nm (2)	595 nm (3)	Vidurkis	konc vnt/mg
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	1,367	1,352	1,335	1,351	0,174
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	1,012	1,010	1,005	1,009	0,129
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	1,295	1,300	1,296	1,297	0,167
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	1,385	1,315	1,293	1,331	0,171
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	1,363	1,330	1,298	1,330	0,171
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	1,320	1,292	1,255	1,289	0,166

7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	1,205	1,193	1,184	1,194	0,153
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	1,219	1,215	1,201	1,212	0,156

Eil. Nr.	Albumino tirpalo tūris, ml	Iki 10 ml skiesto tirpalo koncentracija mg/ml	595 nm (1)	595 nm (2)	595 nm (3)	Vidurkis
1	0,2	0,02	0,130	0,135	0,139	0,135
2	0,4	0,04	0,345	0,347	0,341	0,344
3	0,6	0,06	0,478	0,486	0,473	0,479
4	0,8	0,08	0,610	0,607	0,610	0,609
5	1,0	0,1	0,854	0,831	0,862	0,849
6	1,2	0,12	0,993	0,990	0,991	0,991
7	1,4	0,14	1,073	1,076	1,066	1,072
8	1,6	0,16	1,173	1,277	1,270	1,273
9	1,8	0,18	1,329	1,321	1,345	1,332

21 priedas. Prolindehidrogenazės aktyvumo įvertinimas

Eil.Nr.	Žaliava	595 nm (1)	595 nm (2)	595 nm (3)	Vidurkis	konc mg/ml
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,213	0,211	0,173	0,199	0,024
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,044	0,047	0,045	0,045	0,004
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,032	0,031	0,034	0,032	0,002
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,472	0,442	0,413	0,442	0,059
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,097	0,087	0,076	0,087	0,009
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,710	0,703	0,694	0,702	0,089
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,105	0,094	0,085	0,095	0,010
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,826	0,813	0,810	0,816	0,104

Eil.Nr.	Žaliava	340 nm (1)	340 nm (2)	340 nm (3)	Vidurkis pradžioje
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,537	0,545	0,550	0,544
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,223	0,220	0,218	0,220
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,138	0,134	0,134	0,135

4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,703	0,711	0,712	0,709
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,343	0,331	0,334	0,336
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,487	0,492	0,494	0,491
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,295	0,297	0,296	0,296
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,670	0,675	0,677	0,674

po 3 min

Eil.N r.	Žaliava	340 nm (1)	340 nm (2)	340 nm (3)	Vidurkis po 3 min	μmol NAD/mg
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,566	0,573	0,576	0,572	770,470
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	0,221	0,223	0,221	0,222	328,000
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	0,143	0,144	0,146	0,144	307, 510
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	0,733	0,737	0,744	0,738	321,351
5	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius BAP (1 mg/ml)	0,353	0,333	0,335	0,340	298,182
6	Pipirmėtės stiebų + lapų kalius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	0,520	0,524	0,529	0,524	244,665
7	Pipirmėtės stiebai <i>in vivo</i>	0,299	0,297	0,296	0,297	62,121
8	Pipirmėtės lapai <i>in vivo</i>	0,682	0,683	0,677	0,681	44,359

22 priedas. Tiriamųjų augalų ekstraktų antibakterinis įvertinimas prieš *Xanthomonas campestris*; *Rhizobium radiobacter* bakterijas.

Xanthomonas campestris

Eil.N r.	Žaliava	(x1) mm	(x2) mm	(x3) mm	(x4) mm	(x5) mm	(x6) mm	Vidurkis, mm
1	Šalavijo lapų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	8,00	7,00	08,00	7,00	9,00	7,00	7,67
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	8,00	8,00	7,00	7,00	6,00	6,00	7,00
3	Šalavijo šaknų kalius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	7,00	6,33
4	Pipirmėtės stiebų kalius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	6,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,17

5	Pipirmētēs stiebu + lapu klius BAP (1 mg/ml)	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
6	Pipirmētēs stiebu + lapu klius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
7	Pipirmētēs stiebai <i>in vivo</i>	8,00	8,00	7,00	6,00	6,00	7,00	7,00
8	Pipirmētēs lapai <i>in vivo</i>	8,00	7,00	8,00	7,00	7,00	6,00	7,17
9	Kontrolē Ciprofloksacinas	14,00	15,00	26,00	13,00	16,00	12,00	16,00

Rhizobium radiobacter

Eil.N r.	Žaliava	(x1) mm	(x2) mm	(x3) mm	(x4) mm	(x5) mm	(x6) mm	Vidurki s
1	Šalavijo lapu klius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	9,00	8,00	8,00	7,00	7,00	7,00	7,67
2	Šalavijo žiedai ir stiebai <i>in vivo</i>	8,00	7,00	7,00	7,00	8,00	6,00	7,17
3	Šalavijo šakņu klius NAR (0,1 mg/l); BAP (0,2 mg/l); 2,4-D (0,5 mg/l)	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
4	Pipirmētēs stiebu klius BAP (1mg/l); 2,4-D (0,2 mg/l)	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,17
5	Pipirmētēs stiebu + lapu klius BAP (1 mg/ml)	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
6	Pipirmētēs stiebu + lapu klius TDZ (0,5mg/l); IAR (0,1 mg/l)	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
7	Pipirmētēs stiebai <i>in vivo</i>	8,00	7,00	7,00	7,00	7,00	6,00	7,00
8	Pipirmētēs lapai <i>in vivo</i>	9,00	8,00	7,00	6,00	6,00	7,00	7,17
9	Kontrolē Ciprofloksacinas	17,00	12,00	17,00	19,00	15,00	13,00	15,50