

# Eterična ulja zimzelenog bilja otoka Brača

---

Vasiljević, Daniela

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:078511>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Daniela Vasiljević

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Daniela Vasiljević

**ETERIČNA ULJA ZIMZELENOG BILJA OTOKA BRAČA**  
**ZAVRŠNI RAD**

Voditelj rada: prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Aleksandra Sander doc.

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

doc. dr. sc. Maja Bival Štefan

Zagreb, rujan 2021.

*Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Aleksandri Sander i asistentici mag. ing. cheming. Ani Petračić na strpljenju, pomoći i uloženom trudu prilikom izrade ovog završnog rada te vodstvu i uloženom vremenu pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Također, zahvaljujem se doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela te Sandri Bogdan, dipl.ing.šum. za identifikaciju bilja.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i strpljenju.*

## SAŽETAK RADA

Eterična ulja se koriste kroz cijelu povijest civilizacije. Afinitet ljudi prema korištenju i konzumiranju prirodnih proizvoda rezultiralo je porastom korištenja eteričnih ulja u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te industriji parfema. Zbog svojih ljekovitih svojstava često se koriste u medicini i farmaceutskoj industriji. Sastav eteričnih ulja ovisi o nadmorskoj visini, geografskom položaju i svjetlosti. Na sastav utječe i berba biljne sirovine.

U ovom radu ispitivao se kemijski sastav i antimikrobna aktivnost uzoraka eteričnih ulja, biljnih sirovina s otoka Brača i iz Zagreba, dobivenih hidrodestilacijom. Eterična ulja ekstrahirana su iz alepskog bora (*Pinus halepensis* Miller), čempresa (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*), piramidalnog čempresa (*Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis*) i gluhača (*Juniperus phoenicea*). Provedena je karakterizacija uzoraka tankoslojnom kromatografijom, sustavom plinska kromatografija- spektrometrija masa te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom. Glavne sastavnice u uzorcima eteričnih ulja su:  $\beta$ -kariofilen (54,64%),  $\alpha$ -humulen (11,18%) u alepskom boru (*Pinus halepensis* Miller);  $\alpha$ -pinen (H: 36,42%, V: 32,81-36,86%),  $\delta$ -karen (H: 25,53%, V: 17,94-18%),  $\alpha$ -cedrol (10,54%) u čempresu i piramidalnom čempresu te  $\alpha$ -pinen (49,08%),  $\beta$ -felandren (21,65%), Germakren D (27,01%) u gluhaču. Antimikrobna aktivnost testirana je na kulturi gram-pozitivne bakterije (*B. subtilis*), gram-negativnih bakterija (*E. coli* i *P. aeruginosa*) te na kvascu (*C. lipolytica*).

**Ključne riječi:** *Cupressus sempervirens*, eterično ulje, hidrodestilacija, *Juniperus phoenicea*, *Pinus halepensis* Miller

## ABSTRACT

Essential oils have been used throughout the history of civilization. People's affinity for the use and consumption of natural products has increased the use of essential oils in the food, cosmetics and perfume industry. Due to their medicinal properties, they are often used in medicine and the pharmaceutical industry. The composition of essential oils depends on altitude, geographical location and light. The composition is also affected by the harvest of plant material.

In this paper, chemical composition and antimicrobial activity of samples of essential oils were tested. Plant materials were collected from the island of Brač and from Zagreb, and the essential oils were obtained by hydrodistillation. The essential oils were extracted from aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller), cypress (*Cupressus sempervirens* var. *Horizontalis*), pyramidal cypress (*Cupressus sempervirens* L. var. *Pyramidalis*) and phoenicean juniper (*Juniperus phoenicea*). Characterization of the samples was performed by thin layer chromatography, gas chromatography-mass spectrometry system and infrared spectroscopy with Fourier transform. The main constituents in the samples of essential oils are:  $\beta$ -caryophyllene (54.64%),  $\alpha$ -humulene (11.18%) in aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller);  $\alpha$ -pinene (H: 36.42%, V: 32.81-36.86%),  $\delta$ -karen (H: 25.53%, V: 17.94-18%),  $\alpha$ -cedrol (10, 54%) in cypress and pyramidal cypress and  $\alpha$ -pinene (49.08%),  $\beta$ -phelandrene (21.65%), Germacren D (27.01%) in phoenicean juniper. Antimicrobial activity was tested on a culture of gram-positive bacteria (*B. subtilis*), gram-negative bacterias (*E. coli* and *P. aeruginosa*) and on yeast (*C. lipolytica*).

**Keywords:** *Cupressus sempervirens*, essential oil, hydrodistillation, *Juniperus phoenicea*, *Pinus halepensis* Miller

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Eterična ulja.....	2
2.1.1. Kemijski sastav eteričnih ulja.....	3
2.1.1.1. Glavne komponente.....	4
2.1.2. Faktori koji utječu na kemijski sastav eteričnih ulja.....	5
2.1.3. Industrija eteričnih ulja.....	6
2.2. Uzgoj aromatičnih biljaka.....	7
2.2.1. Biljna porodica Čempresovki (Cupressaceae).....	9
2.2.2. Čempres ( <i>Cupressus sempervirens</i> ).....	10
2.2.3. Gluhač ( <i>Juniperus phoenicea</i> ).....	12
2.2.4. Alepski bor ( <i>Pinus halepensis</i> Miller).....	13
2.3. Metode ekstrakcije eteričnih ulja.....	14
2.3.1. Konvencionalne metode ekstrakcije.....	15
2.3.1.1. Hidrodestilacija.....	15
2.3.1.2. Odošenje vodenom parom.....	16
2.3.1.3. Ekstrakcija organskim otapalom.....	16
2.3.1.4. Hladno prešanje.....	17
2.3.2. Napredne metode ekstrakcije.....	17
2.3.2.1. Ekstrakcija superkričnim fluidima.....	17
2.3.2.2. Ekstrakcija subkričnim fluidima (H <sub>2</sub> O i CO <sub>2</sub> ).....	18
2.3.2.3. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija.....	18
2.3.2.4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	18
2.3.2.5. Trenutni kontrolirani pad tlaka.....	19
2.3. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja.....	20
2.3.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	20

2.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
2.3.3. <i>Escherichia coli</i> .....	21
2.3.4. <i>Candida lipolytica</i> .....	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	23
3.1. Cilj i provođenje eksperimenta.....	23
3.2. Priprema biljnog materijala .....	23
3.3. Ekstrakcija eteričnog ulja hidrodestilacijom .....	24
3.4. Metode karakterizacije .....	25
3.4.1. Plinska kromatografija s masenom spektroskopijom (GC/MS) .....	25
3.4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) .....	26
3.4.3. Tankoslojna kromatografija (TLC) .....	26
3.5. Antimikrobna osjetljivost.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. Hidrodestilacija.....	29
4.2. Kemijski sastav .....	31
4.2.1. Tankoslojna kromatografija (TLC) .....	31
4.2.2. Plinska kromatografija s masenom spektroskopijom (GC/MS) .....	32
4.2.2.1. Kemijski sastav eteričnog ulja alepskog bora .....	32
4.2.2.2. Kemijski sastav eteričnog ulja čempresa .....	33
4.2.2.3. Kemijski sastav eteričnog ulja gluhača .....	37
4.2.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) .....	39
4.2.4. Antimikrobna osjetljivost .....	43
5. ZAKLJUČAK.....	49
Literatura .....	50
PRILOZI.....	56



## 1. UVOD

Eterična ulja su nusprodukti biljaka te se dobivaju destilacijom, ekstrakcijom i raznim mehaničkim metodama iz biljnih sirovina. U biljkama eterična su ulja pohranjena u korijenju, listovima, cvjetovima i u plodovima. Definiraju se kao smjese uljne konzistencije i glavna karakteristika im je da su hlapljive smjese različitih spojeva. Eterična ulja imaju karakterističan miris i okus te su netopljiva u vodi. Od ispitanih 300 biljnih porodica više od 30% sadrži eterično ulje [1]. Uloga eteričnog ulja je stvaranje mirisa kako bi biljka privukla što više kukaca radi oprašivanja te ujedno služi i kao zaštita od napada životinja [1].

Eterična ulja koriste se u proizvodnji parfema, šampona, sapuna, kozmetike i gelova za čišćenje. Koriste se i u prehrambenoj industriji za proizvodnju pića i za aromatiziranje hrane. Uz to imaju primjenu i u poljoprivredi zbog svojih antibakterijskih, protugljivičnih, antivirusnih i antioksidativnih svojstava. Također se primjenjuju u aromaterapiji te u medicinskoj i farmaceutskoj industriji zbog svojih antiseptičkih i analgetičkih svojstava [2]. Procjenjuje se da globalno tržište eteričnih ulja trenutno vrijedi 10,3 milijardi dolara te se očekuje da će doseći vrijednost od 16 milijardi dolara do 2026. godine [3].

Otok Brač, jedan od najsunčanijih otoka na Jadranu sa 2600 sunčanih sati nalazi se u mediteranskom podneblju koje ima zimзелenu vegetaciju. Vegetacija i biljni svijet se razvio na kamenjaru, crnici i crvenici, plitkom sloju humusa na stijenama i u sloju plodne zemlje u dolinama i ponikvama. Uloga šuma je sprječavanje erozije tla. Povećanjem broja stanovništva i potrebe za prostorom, šume su se krčile što je rezultiralo povećanom broju požara i ogoljavanju tla uslijed erozije. Danas je četvrtina otoka prekrivena šumama koje se sastoje od autohtonog alepskog bora, samoniklog crnog bora, primorskog borate čempresa. Svi pripadaju biljnoj skupini četinjača koju karakterizira igličavo drveće te su ženski cvjetovi češeri [4].

U ovom je radu cilj izolirati eterična ulja alepskog bora (*Pinus halepensis* Miller), čempresa (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*), piramidalnog čempresa (*Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis*) i gluhača (*Juniperus phoenicea*) s otoka Brača. Također je izolirano eterično ulje piramidalnog čempresa iz Zagreba. Provedena je karakterizacija uzoraka tankoslojnom kromatografijom, sustavom plinskakromatografija- spektrometrija masa te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom. Također je ispitan i antimikrobni utjecaj eteričnih ulja disk-difuzijskim testom.

## 2. OPĆI DIO

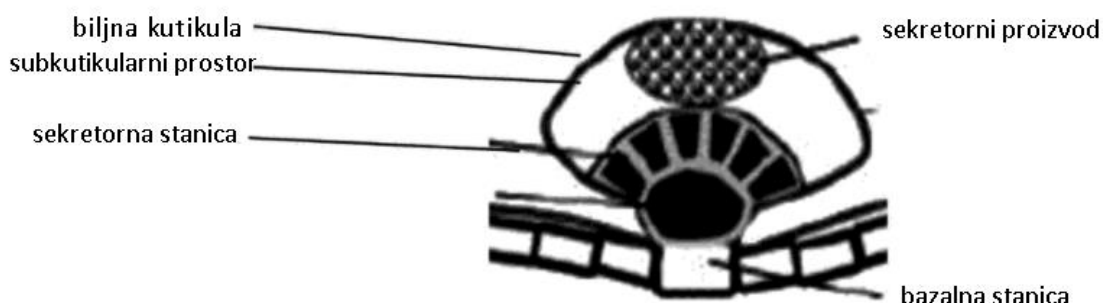
### 2.1. Eterična ulja

Uporaba eteričnih ulja započela još 10 000 godina prije Krista. Eterično ulje se koristilo kao začin, lijek protiv bolesti te u brojnim religijskim obredima zbog svojih ljekovitih svojstava ugodnog mirisa [5]. Možda jedan od najvažnijih medicinskih zapisa o drevnom Egiptu, *Papyrus Ebers*, koji datira još iz 1550. godine prije Krista, sadrži 700 formula i lijekova koji uključuju eterična ulja.

Prva istraživanja eteričnih ulja i ispitivanje njihovih sastojaka mogu se pripisati francuskom kemičaru M.J. Dumasu koji je analizirao ugljikovodike, kisik, sumpor i dušik u eteričnim uljima. Nakon Dumasa, O. Wallach je pomoću svojih istraživanja otkrio da se eterična ulja sastoje od terpena, koji su često bili opisani različitim imenima, no zapravo su kemijski isti [5].

Eterična ulja su kapljevite hlapljive složene smjese, male molekulske mase koje se nalaze u aromatičnim biljkama kao sekundarni metaboliti. Biljke ga prirodno sintetiziraju za obranu ili privlačenje insekata, biljojeda ili drugih organizama [6]. Ponekad komponente eteričnog ulja mogu usporiti razmnožavanje insekta koji jede biljku, primjerice skakavci koji jedu šilj (*Cyperus iria*) postaju sterilni [7].

Miris i okus eteričnih ulja odbija puno životinja te ih onda neće jesti. S druge strane postoje i neka eterična ulja u biljkama koja privlače insekte i tako povećavaju oprašivanje. Razlog su kemijski spojevi u mirisnim žlijezdama insekata koji se također nalaze i u cvjetnim mirisima [7].



**Slika 1.** Struktura žlijezdanih dlaka u kojima se pohranjuje eterično ulje [8].

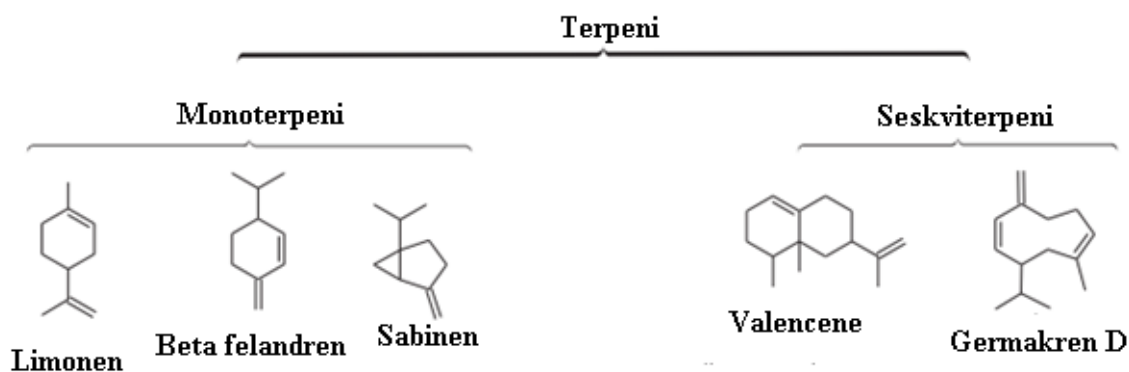
Eterično ulje može se proizvesti u svim biljnim organima poput: sjemena, cvijeća, lišća, pupoljaka i korijenja. Ulje se pohranjuje u posebnim sekretornim strukturama koja mogu biti

na površini biljke ili u unutrašnjosti [7]. Sekretorne strukture uključuju uljne kanale, žlijezde, žlijezdane dlake, smolaste kanale i trihome biljke (**Slika 1.**) [6,7].

### 2.1.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Eterična ulja su vrlo složene višekomponentne smjese te ovisno o vrsti eteričnog ulja i vrsti detekcije može se identificirati do 400 komponenata unutar ulja [6,9]. Komponente uključuju terpenoide i fenilpropanoide no mogu biti prisutne i ostale komponente poput aromatskih i alifatskih sastojaka [6]. Koncentracija svake komponente može varirati.

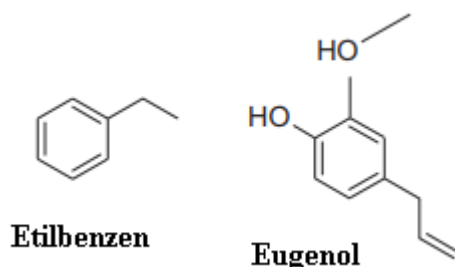
U eteričnim uljima najzastupljeniji spojevi su terpenoidi. Terpenoidi ili terpeni su hlapljivi ugljikovodici proizvedeni od izoprenskih jedinica ( $C_5H_8$ ). Unutar terpenske skupine postoji nekoliko vrsta terpena podijeljenih po broju izoprenskih jedinica. Glavne skupine terpena u eteričnim uljima su monoterpeni ( $C_{10}$ ) i seskviterpeni ( $C_{15}$ ). Također su važni i hemiterpeni, diterpeni, triterpeni i tetraterpeni [6]. Oni predstavljaju oko 90% eteričnih ulja.



**Slika 2.** Primjeri nekih terpena koji se nalaze u eteričnim uljima [6].

Monoterpeni su izgrađeni od dvije izoprenske jedinice te imaju 10 atoma ugljika ( $C_{10}H_{16}$ ). Izopren ili 2-metil-1,3-butadien u monoterpenu se sintetizira kao aktivirana molekula izopentenil pirofosfat (IPP) ili dimetilalil pirofosfat (DMAPP) [10]. Postoje tri vrste monoterpena: linearni (aciklički), monociklički i biciklički [9]. Seskviterpeni su izgrađeni od 3 izoprenske jedinice te imaju 15 atoma ugljika ( $C_{15}H_{24}$ ). Oni se mogu pojaviti u acikličkom, monocikličkom, bicikličkom i tricikličkom obliku te obično imaju veću temperaturu vrenja od ostalih terpena. Monoterpeni i seskviterpeni (**Slika 2.**) su važni u eteričnim uljima jer su oni odgovorni za karakteristični miris ulja i hlapljivost [9].

U eteričnim uljima također su prisutni i aromatski spojevi (**Slika 3.**), no u znatno manjoj koncentraciji nego terpeni. Aromatski spojevi u eteričnim uljima obično potječu od fenilpropana a sadrže aldehyd, alkohol, fenole, metoksi derivate te spojeve metiledioksi [6].



**Slika 3.** Primjeri nekih aromatičnih spojeva koji se nalaze u eteričnim uljima [6].

### 2.1.1.1. Glavne komponente

U radu su analizirani uzorci eteričnog ulja čiji sastav sadrži:

- **$\alpha$ -pinen:** organski spoj polifenolne skupine terpena, biciklički monoterpen. Česta komponenta aromatičnih biljaka poput metvice, bosiljka i psidija. Djeluje kao snažan antioksidans te ima protuupalni, antikancerogeni i antikoagulantni učinak. Ima fungicidna, antivirusna i antibakterijska svojstva; sastojak lijekova za bubrege i jetru. Također je inhibitor karcinoma dojke i leukemije [11].
- **$\delta$ -karen:** monoterpen koji se koristi u kozmetičkoj industriji zbog svog ugodnog mirisa. Također se koristi kao sredstvo protiv kukaca na industrijskoj razini. Karakterizira ga sladak i oštar miris koji se sastoji od mirisa citrusa, čempresa, bora i drveta. Pomože u borbi protiv upala, obnavlja bolesne i oštećene kosti te potiče fokus i koncentraciju.  $\delta$ -karen je jedinstven zbog svoje sposobnosti izvlačenja tekućine. To svojstvo se najviše koristi u kozmetičkoj industriji [12].
- **$\alpha$ -cedrol:** bioaktivni seskviterpen, snažan kompetitivni inhibitor enzima citokroma. Djeluje antiseptično, antifungicidno, insekticidno i protuupalno. Također ima učinak protiv grčeva i dijareje [13].

- **$\beta$ -kariofilen:** primarni seskviterpen koji doprinosi začinjenosti crnog papra. Glavni je sastojak klinčića, hmelja i ružmarina. Veže se za endokanabinoidni sustav kod ljudi. Djeluje protuupalno te može biti izravno koristan za ulcerozni kolitis, osteoartritis, dijabetes, cerebralnu ishemiju, tjeskobu i depresiju, fibrozu jetre te bolesti nalik Alzheimeru [14].
- **$\alpha$ -humulen:** karakterističan terpen hmelja. Izomer je  $\beta$ -kariofilena koji je otvoren prstenom. Posjeduje lokalno i sistemsko protuupalno djelovanje te je učinkovit analgetik [14].
- **$\beta$ -felandren:** ciklični monoterpen te izomer koji je povezan dvostrukom vezom. Netopljiv je u vodi ali se može pomiješati s eterom. Široko je rasprostranjen u eteričnim uljima poput eteričnih ulja mente, eukaliptusa i anđelike. Koristi se u mirisima zbog svoje ugodne arome. Miris  $\beta$ -felandrena opisan je kao blago citrusni i papreno-mentast. Zbog svoje ugodne arome, koristi se u prehrambenoj industriji [15].
- **germakren D:** hlapljivi organski ugljikovodik, seskviterpen. Ima antibakterijsko i antifugalno djelovanje te se može koristiti kao pomoćno sredstvo u primjeni aminoglikozida i azeola [16].

### 2.1.2. Faktori koji utječu na kemijski sastav eteričnih ulja

Sastav eteričnih ulja razlikuje se ovisno o državi proizvodnje ljekovitog bilja i o proizvođaču ulja. Razlike postoje čak i kod istog proizvođača zbog različite kvalitete usjeva iz godinu u godinu. Čimbenici koji mogu utjecati na kemijski sastav eteričnog ulja su: parametri biljke, parametri okoliša, parametri tijekom žetve, proizvodni parametri i ostali parametri. Parametri biljke uključuju vrstu biljke te sam uzgoj biljke, je li samonikla ili kultivirana. Parametri okoliša uključuju podrijetlo biljke, klimu u kojoj raste, stanje tla i uporabu gnojiva. Berba i parametri nakon žetve podrazumijevaju sezonu berbe, predtretman biomase i uvjete skladištenja biljke. Proizvodni parametri uključuju način proizvodnje, uvjete provedbe destilacije te je li se proizvodi ulje za komercijalnu primjenu ili ulje za testiranja u laboratoriju. Također su bitni i drugi parametri koji uključuju uvjete i vrijeme skladištenja ulja, starost eteričnog ulja te samo starenje eteričnog ulja uslijed izlaganja kisiku i ultraljubičastom zračenju [6].

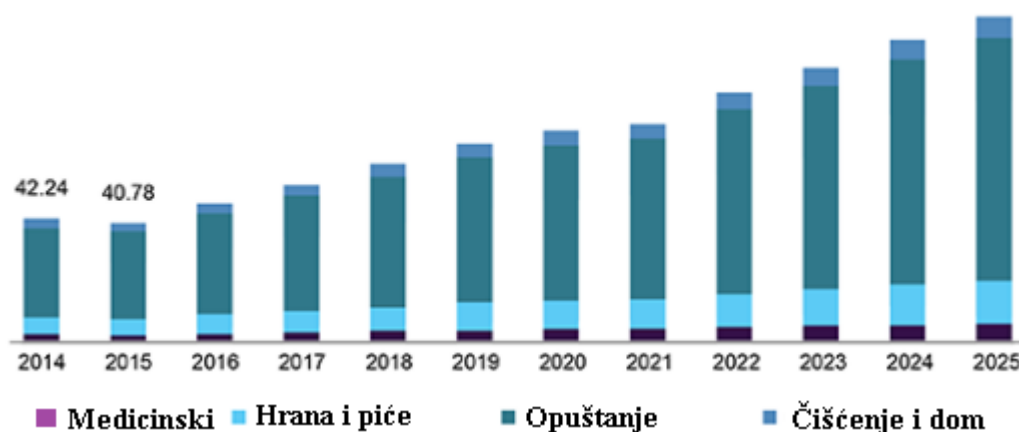
### 2.1.3. Industrija eteričnih ulja

Eterična ulja posebno su popularna u narodnoj medicini gdje se koriste kao lijek protiv raznih tegoba zbog svoje biološke aktivnosti. Biološka aktivnost eteričnih ulja podrazumijeva antibakterijsko, antioksidativno, antivirusno i insekticidno djelovanje. Zbog svoje biološke aktivnosti, eterična ulja se koriste za izradu lijekova, konzerviranje hrane, aromaterapiju i izradu kozmetike i parfema [17]. I dalje se istražuje korištenje eteričnih ulja u tretmanu zaraznih bolesti koje mogu zamijeniti farmaceutske lijekove. Danas se eterična ulja najviše koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj i parfemskoj industriji [17].

Veliki problem farmaceutske industrije je nepotrebno korištenje antibiotika koji su doveli do bakterijske rezistencije i potrebe za pronalaskom novih i učinkovitih načina borbe s bakterijskim zarazama i infekcijama uzrokovanim patogenim mikroorganizmima [6]. Rezistencija na antibiotike rezultat je neprikladne uporabe antibiotika, uporabe neodgovarajućih doza te genetske mutacije mikroorganizama. Trenutno bakterijske infekcije predstavljaju ozbiljan problem u svijetu, pogotovo bakterije koje utječu na veliki broj pacijenata. Procijene su da je bakterijska rezistencija odgovorna za oko 50 000 smrtnih slučajeva godišnje u Sjedinjenim Američkim Državama i Europi [6]. Jedno od rješenja ovog problema su upravo eterična ulja. Istražuje se antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja za postizanje kontrole nad mikroorganizmima rezistentnim na antibiotike.

Ubrzani način životarezultirao je porastom mentalnih bolesti poput depresije, tjeskobe, nesanicice i stresa a u tretiranju tih bolesti aromaterapijom mogu se koristiti eterična ulja. Sklonost potrošača prema organskim i prirodnim proizvodima dovodi do povećanog korištenja eteričnih ulja u izradi proizvoda. Eterična ulja imaju ključnu ulogu u tretiranju dermatoloških tegoba poput osipa, akni, ekcema i psijoraze, što ih čini prikladnim za tržište njege kože. Aromatično bilje bogato je kalcijem, fosforom, magnezijem i cinkom te vitaminima C i E. Također, bogato je fitokemikalijama poput polifenolnih spojeva, alkaloida, kinina i pigmenata koji imaju terapijsku vrijednost [18].

Tržište eteričnih ulja raste jer uporaba istih nema nuspojava, a sintetske kemikalije imaju nuspojave te su manje poželjne u proizvodima (**Slika 4.**). Prema zadnjim istraživanjima *Global Market Insights-a*, svjetsko tržište eteričnih ulja će vrijediti preko 13 milijardi dolara do 2024. godine [17].



**Slika 4.** Tržišta eteričnog ulja mente u Sjedinjenim Državama od 2014. do 2028. (milijuni USD) [19].

## 2.2. Uzgoj aromatičnih biljaka

Eterična ulja mogu se dobiti od samoniklog bilja s prirodnog staništa ili se aromatične biljke mogu uzgajati. Preferira se kultiviranje odnosno uzgoj aromatičnih vrsta zbog očuvanja prirodnih populacija i biološke raznolikosti te zbog kvalitete biljnog materijala. Samonikle vrste zbog križanja i formiranja novih vrsta mogu imati različit kemijski sastav što je za farmaceutsku industriju nepovoljno [18]. Područje gdje se uzgaja aromatično bilje je bitno zbog utjecaja klimatskih čimbenika (**Tablica 1.**).

Pod klimatske čimbenike ubrajamo [18]:

- 1. Zrak** - za rast biljaka najvažniji dušik za fiksaciju dušika, kisik za procese disanja i ugljikov dioksid za process fotosinteze.
- 2. Toplina** – utječe na količinu djelatnih tvari u biljci, definira se pomoću optimalne temperature pri kojoj biljka najviše raste i prikuplja djelatne tvari. Sjeme nekih biljaka neće klijati ako je temperatura ispod ili iznad biološkog minimuma.
- 3. Voda** – nedostatak vode u tlu rezultirat će manjim brojem cvijetova i stvaranju eteričnog ulja u manjoj mjeri. Potrebno je utvrditi koliko je vode potrebno biljki.
- 4. Svjetlost** – potrebne su značajne količine svjetlosti, zbog toga se najviše aromatičnih biljki sadi u južnim krajevima. Također postoje vrste koje ne zahtijevaju puno svjetlosti, no njih je malo (kopriva).

**5. Zemljopisna širina i nadmorska visina** – porastom nadmorske visine, uglavnom se povećavakoličina djelatnih tvari, no kod nekih vrsta je obrnuto.

**6. Alelopatija** – utjecaj jedne biljke na drugu te izlučivanje alelokemikalija koje mogu inhibirati i stimulirati rast biljaka. Potrebno je utvrditi koje se biljke smiju nalaziti u blizini aromatične biljke koja se sadi.

**7. Tlo** – bitne su fizikalne i kemijske karakteristike. Fizikalne karakteristike podrazumijevaju teksturu i strukturu, dok kemijske karakteristike podrazumijevaju pH vrijednost i količinu humusa. Tlo je posebno bitan faktor za uzgoj vrsta kod kojih se koristi korijen (bijeli slijez).

**Tablica 1.** Podjela aromatičnih vrsta prema porijeklu [18].

Vrste mediteranskog i submediteranskog područja	Vrste kontinentalnog područja
<i>Althea officinalis</i> - bijeli slijez	<i>Amica montana</i> – brđanka, gorska moravka
<i>Borago officinalis</i> - boreč	<i>Digitalis lanata</i> – vunasti naprstak
<i>Brassica nigra</i> – gorušica, slančica crna	<i>Echinacea sp.</i> – pupavica, rudbekija
<i>Calendula officinalis</i> – neven	<i>Hypericum perforatum</i> – gospina trava
<i>Capparis spinosa</i> – kapara	<i>Malva silvestris</i> – crni slijez
<i>Coriandrum sativum</i> – korijandar	<i>Matricaria chamomilla</i> – kamilica
<i>Foeniculum vulgare</i> – komorač	<i>Melissa officinalis</i> – matičnjak
<i>Helichrysum italicum</i> – smilje	<i>Mentha x piperita</i> – metvica
<i>Lavandula angustifolia</i> – lavanda	<i>Ocimum basilicum</i> – bosiljak
<i>Origanum vulgare</i> – mravinac	<i>Oenothera biennis</i> – pupoljka
<i>Ruta graveolens</i> – ruta	<i>Origanum majorana</i> – mažuran
<i>Sinapis alba</i> – slačica bijela	<i>Papaver somniferum</i> – vrtni mak
<i>Salvia officinalis</i> – kadulja	<i>Urtica dioica</i> – kopriva
<i>Satureia hortensis</i> - čubar	<i>Valeriana officinalis</i> - odoljen

Na ekološke čimbenike pri uzgoju aromatičnog bilja utječe se primjenom agrotehničkih zahvata poput navodnjavanja, gnojidbe, malčiranja, odabirom prikladnih sorti za uzgoj, odabirom načina razmnožavanja te načinom berbe. Najbitniji agrotehnički zahvat je gnojdbakoja osigurava nutritivnu kvalitetu sirovine. Berbu je poželjno obaviti u ranojutarnjim satima i kad je suho vrijeme. Optimalno vrijeme berbe ovisi o vrsti biljke te konačnoj namjeni biljke. Berbu je poželjno obaviti ručno ako se radi o manjim kapacitetima proizvodnih površina. Sakupljaju se biljni dijelovi koji sadrže najveće količine aktivne tvari. Ovisno o vrsti aromatične biljke postoje različita pravila berbe.



Nakon berbe svježiu sirovinu potrebno je što prije prenijeti do mjesta obrade ili prerade zbog potencijalnog gubitka kvalitete sirovine. Najčešći postupak dorade ili prerade aromatičnog bilja je sušenje na sobnoj temperaturi. Pri smanjenju sadržaja vode u biljci zaustavlja se mikrobiološka aktivnost te ostali biokemijski procesi koji mogu narušiti kvalitetu proizvoda. Sušenje se provodi prirodnim putem (uklanjanje vode izlaganjem bilja sunčevom zračenju i prirodnom strujanju zraka) ili u kontroliranim uvjetima u uređajima (sušionice) [18].

### 2.2.1. Biljna porodica Čempresovki (Cupressaceae)

Biljna porodica Čempresovki, *Cupressaceae*, iz reda *Pinales* ima 30 rodova sa 133 vrstazimzelenogdrveća i grmlja rasprostranjenih po cijelome svijetu. Listovi čempresovke su nasuprotni i uvijeni i često se nalaze u paru ili po tri. Zreli listovi su tanki, uski, ljuskasti i uz grančice. Muške reproduktivne strukture nalaze sena kraju grančica, a ženske reproduktivne strukture su češeri i terminalni su. Češeri su obično drvenasti. Najpoznatiji rodovi iz biljne porodice čempresa su [20]:

- Čempres, *Cupressus*
- Tuja, *Thuja*
- Borovica, *Juniper*
- Obalna sekvoja, *Sequoia sempervirens*

Za potrebe ovog rada korišteni su čempres, piramidalni čempres, gluhač te alepski bor iz porodice Borovki (*Pinaceae*).

### 2.2.2. Čempres (*Cupressus sempervirens*)

Čempres (*Cupressus sempervirens*) poznat kao i Mediteranski čempres je zimzeleno stablo koje može narasti do 35 metara visine [21,22]. Njihov period cvjetanja je od ožujka do svibnja. Čempres ima oblik krošnje piramidast ili valjkast te su mulistovi tamnozeleni, tanki, kratki i ljuskasti. Cvjetovi čempresa su jednospolni i jednodomni te su muški i ženski cvjetovi su na istom stablu. Češeri (**Slika 5.**) su veličine od 3 do 4 centimetara te su kuglasti i imaju 8-14 odrvenjenih ljustaka. Drvo čempresa je čvrsto i izdržljivo [21].



**Slika 5.** Češeri čempresa s otoka Brača

Postoje dvije vrste čempresa:

- var. *horizontalis* (ženski) – prepoznaje se po horizontalnim granama i širokoj krošnji. (**Slika 6.**)
- var. *pyramidalis* (muški) – prepoznaje se po gustoj, piramidalnoj krošnji koja se sužava pri vrhu, grane su uspravne. (**Slika 7. i 8.**)

Prirodno stanište čempresa je na području istočnog Sredozemlja te ga se može vidjeti kao ukrasno stablo u parkovima i vrtovima [21]. Također raste u sjevernoj Americi, Africi, jugoistočnoj Europi i zapadnoj Aziji [22]. Čempres je otporan na visoke temperature te dobro podnosi sušu. Hladne temperature može podnijeti do -20 °C.

Sadnja čempresa može zaštititi polja od oštećenja zbog vjetra [22]. Također, čempres se sadi kao preventivna mjera zaštite od požara. Čempresi imaju tri puta deblju koru nego ostala stabla što im omogućuje težu zapaljivost. Težoj zapaljivosti pridonosi i visoki postotak vode u lišću u uvjetima suše i vrućina. Čempres stvara gusti pokrov na tlu koji onemogućuje rast ispod stabla što sprječava širenje požara. Stabla čempresa dobro ponose sušu i nekvalitetno tlo [23].

Izmrvljeni češeri se koriste za proširene vene i hemoroide te za poboljšavanje cirkulacije. Eterično ulje češera se dobiva iz grančica i listova te se koristi dermalno kod problema s venama, hemeroidima i kao limfotonik [21]. Eterično ulje čempresa ima snažno antimikrobno, antivirusno i antifungalno djelovanje. Antivirusno djelovanje ulja je pokazano na *Herpes simplex* virusu tipa 1 (HSV-1) imajući učinak od 68% i 53,2% pri koncentracijama 1:32 i 1:64. Antimikrobno djelovanje ulja je dokazano na preživljavanju i rastu tri patogena organizma: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Listeria innocua*. Dokazano je i antifungalno djelovanje ulja na širok spektar gljiva (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, i *C. albicans*) [22].



**Slike 7. i 8.** Piramidalni čempres (*Cupressus sempervirens* var. *pyramidalis*) s otoka Brača (lijevo) i iz Zagreba (desno)



**Slika 6.** Ženski čempres (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*) s otoka Brača

### 2.2.3. Gluhač (*Juniperus phoenicea*)

Gluhač (*Juniperus phoenicea*) ili primorska somina iz porodice čempresa je niže stablo ili zimzeleni grm koji može narasti do 8 metara visine (**Slika 9.**). Krošnja je gusta te se sastoji od brojnih, tankih i horizontalnih grana, a drvo je tvrdo i otporno. Igljice na granama su glatke i igličaste, a kasnije postaju ljuskaste, dužine do 6 mm. Gluhač ima plod koji se nalazi na peteljci dužine do 5 mm. Plod je okruglasti češer veličine 0,5-1,5 cm te je sjajan i crvenosmeđe boje. Sezona cvjetanja gluhača je od veljače do travnja [24].



**Slika 9.** Gluhač (*Juniperus phoenicea*) s otoka Brača (plod i stablo).

Gluhač raste na području Mediterana, no ima veliku geografsku rasprostranjenost u rasponu od Portugala do Saudijske Arabije [24,25]. U Hrvatskoj Gluhač raste na priobalnom području na suhom i neplodnom tlu, u makiji i kamenjaru. Dobro podnosi posolicu i buru te ga možemo naći do 700 metara nadmorske visine [24].

Gluhač se smatra važnom ljekovitom biljkom, njegovo lišće koristi se za liječenje dijabetesa, dijareje i reume [19]. Plodovi nisu otrovni ali se ne koriste u prehrani [24]. Lišće gluhača koristi se protiv plućnih bolesti i kao diuretik. Mješavina lišća i plodova gluhača koristi se kao oralni hipoglikemijski agens [25].

#### **2.2.4. Alepski bor (*Pinus halepensis* Miller)**

Alepski bor (*Pinus halepensis* Miller) iz porodice Borovki (*Pinaceae*) zimzeleno je stablo koje može narasti do 20 metara visine. Krošnja alepskog bora je nepravilna, može biti okruglasta ili piramidalna te su deblo i grane zakrivljene (**Slika 10.**). Listovi alepskog bora su igličasti, plavozelene boje te im je veličina 6-15 cm. Skupljeni su po 2 ili 3 lista i tanki su, mekani i glatki. Cvjetanje alepskog bora je u travnju i svibnju te su cvjetovi jednospolni. Muške cvjetove karakterizira crvenosmeđa boja i valjkasti oblik. Češeri su jajastog oblika i veličine 5-10 cm i širine 4 cm [26].

Alepski bor raste na području Sredozemlja na skromnim i oskudnim terenima te se uglavnom nalazi na priobalnom području. Prilagodljiv je raznovrsnim tipovima tla i može tolerirati sušu. Otporan je na jake vjetrove te mu pogoduje toplina i svjetlost. Kao ukrasno stablo nalazi se u parkovima i nasadima [26].

Drvo alepskog bora je tvrdo i izdržljivo te se koristi u drvenoj industriji. Također se može koristiti i zbog smole [26]. Eterično ulje alepskog bora se koristi kao miris u kozmetičkoj industriji, kao dodaci aromama za hranu i piće te kao miris u proizvodima za kućanstvo [27]. Igljice alepskog bora se koriste za čaj [26].

Igljice alepskog bora naširoko se koriste kao biološki pokazatelji zbog svoje rasprostranjenosti po svijetu te zbog jednostavnosti prikupljanja uzorka. Prema istraživanju Zeinera i suradnica [28] utvrđeno je da metali, poput kadmija i olova, u ekstraktu znatno mijenjaju potencijalno korištenje alepskog bora u medicinske svrhe. Eterično ulje alepskog bora pokazuje nootropna i neuroprotektivna svojstva koje pomažu u liječenju Alzheimerove

bolesti. Metali u ekstraktu ovise o uvjetima okoliša, razini onečišćenja i geografskoj poziciji [28].



**Slika 10.** Alepski bor (*Pinus halepensis* Miller) s otoka Brača (češeri i stablo).

### 2.3. Metode ekstrakcije eteričnih ulja

Eterična ulja se dobivaju iz biljnih sirovina raznim metodama ekstrakcije. Metode ekstrakcije se mogu podijeliti u dvije kategorije [29]:

- Konvencionalne i klasične metode
- Napredne i inovativne metode

Konvencionalne metode:

- Hidrodestilacija
- Odošenje vodenom parom
- Ekstrakcija organskim otapalom
- Hladno prešanje

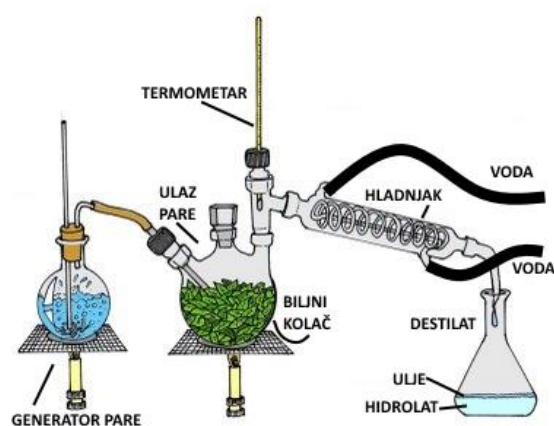
Napredne metode:

- Ekstrakcija superkritičnim fluidima
- Ekstrakcija subkritičnim fluidima
- Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija
- Ekstrakcija mikrovalovima
- Trenutni kontrolirani pad tlaka

## 2.3.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

### 2.3.1.1. Hidrodestilacija

Hidrodestilacija je najjednostavnija i najstarija metoda ekstrakcije eteričnih ulja. Biljni materijal uronjen je u vodu te se zagrijava do vrenja. Ekstrakcijski uređaj uključuje izvor grijanja, koji zagrijava posudu u kojoj se nalazi biljna sirovina i voda, kondenzator i dekanter za prikupljanje kondenzata i odvajanje ulja od vode (**Slika 11.**). Pri atmosferskom tlaku i tijekom procesa zagrijavanja, molekule vode i eteričnog ulja tvore heterogenu smjesu koja postiže nižu temperaturu vrenja blizu 100 °C. Zatim se heterogena smjesa destilira u isto vrijeme kao da je pojedinačan spoj. Prednost vode kao otapala je što se ne može miješati s većinom terpenkih molekula u eteričnim uljima pa se eterično ulje može lako odvojiti dekantiranjem. Za određivanje prinosa eteričnih ulja se preporučuje hidrodestilacija po Clavengeru jer omogućuje recikliranje kondenzata. Ova metoda je pogodna za ekstrakciju latica i cvijetova kako bi se izbjeglo zbijanje biljnog materijala tijekom ekstrakcije [29].



Slika 11. Aparatura za hidrodestilaciju [30].

### 2.3.1.2. Odnosenje vodenom parom

Odnosenje vodenom parom jedna je od komercijalnih metoda dobivanja eteričnih ulja te se često koristi. Temelji se na istom principu kao hidrodestilacija. Jedina razlika je što nema izravnog kontakta između biljne sirovine i vode.

Postoje tri varijante odnošenja vodenom parom [29]:

- **Parna hidrodestilacija** – ekstrakcija se odvija u alembiću, rešetka odvaja biljnu sirovinu od doticaja vode. Ekstrakcija se vrši injektiranjem vodene pare koja prelazi biljnu sirovinu odozdo prema gore i tako nosi hlapljive materijale
- **Parna destilacija** – temelji se na istom principu kao i parna hidrodestilacija ali stvaranje pare se odvija izvan alembića. To dopušta da para bude zasićena ili pregrijana i malo iznad atmosferskog tlaka te se onda odvodi u donji dio ekstraktora gdje prolazi kroz sirovinu.
- **Hidrodifuzija** – poseban slučaj parne destilacije gdje je protok pare prema dolje.

### 2.3.1.3. Ekstrakcija organskim otapalom

Biljni materijal je maceriran u organskom otapalu te se ekstrakt koncentrira uklaňanjem otapala u uvjetima sniženog tlaka [29]. Otapalo se pomiješa s biljnim materijalom te se zagrijava kako bi se ekstrahiralo eterično ulje nakon čega slijedi filtriranje. Filtrat se koncentrira isparavanjem otapala. Koncentrat se zatim pomiješa s čistim alkoholom za ekstrakciju ulja te se destilira pri niskoj temperaturi. Alkohol apsorbira miris i kad ispari ostaje eterično ulje [31]. Ekstrakcija organskim otapalom se primjenjuje za krhke ili osjetljive cvjetne materijale koji su osjetljivi na povišenu temperaturu.

Najčešća otapala za ekstrakciju su [31]:

- aceton
- *n*-heksan
- metanol ili etanol
- petrolejski eter



#### **2.3.1.4. Hladno prešanje**

Hladno prešanje je tradicionalna metoda za ekstrakciju eteričnog ulja iz korica agruma. Tijekom ekstrakcije dolazi do pucanja vrećica ulja koje sadrže eterično ulje u biljci te se oslobađaju hlapiva ulja. Ulje se uklanja mehaničkim hladnim prešanjem te se dobije vodenasta emulzija. Naknadnim centrifugiranjem ponovno se izdvaja ulje [29].

### **2.3.2. Napredne metode ekstrakcije**

#### **2.3.2.1. Ekstrakcija superkritičnim fluidima**

Kapljevine postizu superkritično stanje pri uvjetima kritičnog tlaka i temperature, a svojstva se razlikuju od svojstava kapljevina i plinova. Superkritične fluide karakterizira viskoznost bliska plinovima te gustoća bliska kapljevinama [29]. Difundiraju u poroznu strukturu poput plinova te imaju sposobnost otapanja različitih tvari.

Najčešće korišteno otapalo za ekstrakciju je ugljični dioksid zbog brojnih prednosti poput [29]:

- lakog postizanja kritične točke
- neagresivnosti za termolabilne molekule biljke
- kemijski je inertan i netoksičan
- nezapaljivosti
- dostupnosti u visokoj čistoći pri relativno niskoj cijeni
- jednostavnost uklanjanja iz ekstrakta
- polaritet sličan pentanu te je pogodan za ekstrakciju lipofilnih spojeva

Ekstrakcija superkritičnim fluidna ekstrakcija temelji se na upotrebi i recikliranju fluida u cikličkim koracima kompresije i dekompresije. Primjerice, stlačivanjem i zagrijavanjem ugljikovog dioksida dolazi do postizanja superkritičnog stanja. Zatim ugljikov dioksid prolazi kroz biljnu sirovinu. U procesu dekompresije ekstrakt se usmjerava u jedan ili više separatora gdje se ugljikovom dioksidu postepeno smanjuje tlak što rezultira smanjenjem sposobnosti otapanja. Dekompresijom se postiže separacija dobivenog ekstrakta iz fluida [29].

### **2.3.2.2. Ekstrakcija subkritičnim fluidima (H<sub>2</sub>O i CO<sub>2</sub>)**

Subkritično stanje postiže se kada je tlak veći od kritičnog tlaka, a temperatura je niža od kritične temperature ili obrnuto. U subkritičnom stanju voda i ugljikov dioksid su najčešće korišteni fluidi za ekstrakciju eteričnih ulja [29].

Dobiveni fluidi imaju sljedeća svojstva [29]:

- niska viskoznost
- gustoća bliska gustoći kapljevine
- difuzivnosti između plina i kapljevine

Subkritično ekstrahiranje vodom omogućuje brzu ekstrakciju koristeći niske radne temperature. Time se izbjegava gubitak i propadanje hlapivih i termolabilnih spojeva. U uvjetima subkritičnog stanja, ugljikov dioksid se ponaša kao nepolarno otapalo. Kvaliteta ekstrakta dobivenih subkritičnom ekstrakcijom ugljikovim dioksidom je veća nego kvaliteta ekstrakta dobivenih subkritičnom ekstrakcijom pomoću vode. Još neke od prednosti ove metode su jednostavnost, niska cijena, povoljan utjecaj na okoliš, kraće vrijeme ekstrakcije i veća kvaliteta ekstrakta. Metoda superkritične fluidne ekstrakcije je skuplja za provedbu od metode subkritične ekstrakcije jer instalacija zahtijeva posebnu opremu [29].

### **2.3.2.3. Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija**

Ultrazvuk omogućuje pojačavanje i selektivnost ekstrakcije eteričnih ulja ubrzavajući njihovo oslobađanje iz biljne sirovine kad se koristi u kombinaciji s drugim tehnikama. Biljna sirovina je uronjena u vodu ili otapalo te je podvrgnuta djelovanju ultrazvuka. Ova metoda se najčešće koristi pri ekstrakciji eteričnih ulja iz sjemenki. Koriste se ultrazvučni valovi u rasponu od 20 kHz do 1 MHz. Ultrazvučni valovi u tom rasponu izazivaju mehaničke vibracije stijenke i membrane biljnog ekstrakta koje izazivaju brzo otpuštanje kapljica eteričnog ulja [29].

### **2.3.2.4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima**

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi s frekvencijom u rasponu od 300 MHz i 30 GHz i valne duljine između 1 cm i 1 m. Najčešća korištena frekvencija je 2450 MHz što

odgovara valnoj duljini od 12,2 cm. Ova metoda ekstrakcije se razvila sa razvojem koncepta zelene ekstrakcije i potrebe za novim metodama ekstrakcije zbog uštede energije [29].

Postoje tri varijante ekstrakcije mikrovalovima [29]:

- **Ekstrakcija mikrovalovima bez otapala:** kombinacija toplinske energije mikrovalova i suhe destilacije. Sastoji se od suhe destilacije biljne sirovine mikrovalovima pri atmosferskom tlaku bez dodavanja vode ili organskog otapala. Selektivno zagrijavanje biljnog materijala izaziva oticanje biljnog tkiva što rezultira pucanjem žlijezda. Tako se oslobađa eterično ulje koje spontano isparava uz vodu prisutnu u biljci. Ova tehnika omogućuje ekstrakciju u 30 minuta.
- **Mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija:** biljna sirovina se stavlja u obrnuti mikrovalni reaktor bez vode ili otapala. Zagrijavanjem biljne sirovine, zagrijava se voda unutar biljke što rasteže biljne stanice i dolazi do pucanja žlijezda i tako se oslobađa eterično ulje. Pod utjecajem gravitacije ekstrakti se kreću odozgo prema dolje te idu u sustav hlađenja.
- **Mikrovalna parna destilacija i parna difuzija:** u usporedbi s konvencionalnom parnom destilacijom, mikrovalna parna destilacija je učinkovitija te isti prinos postiže unutar 6 minuta dok parna destilacija postiže isti prinos u 2 sata. Mikrovalna parna difuzija ima isti princip rada kao i mikrovalna parna destilacija osim što pare teku kroz biljni materijal i idu prema dolje.

### 2.3.2.5. Trenutni kontrolirani pad tlaka

Sastoji se od četiri koraka: stavljanje biljnog materijala pod vakuum, primjena parne kupke pod određenim tlakom i temperaturom, trenutno ispuštanje biljnog materijala i vraćanje na atmosferski tlak. Metoda se odvija u reaktoru koji se zagrijava pomoću zasićene pare pod tlakom od 5 kPa do 1 MPa. Pneumatski ventil spaja vakuumski spremnik i posudu za obradu. Eterično ulje se oporavlja kao stabilna ulja u vodenoj emulziji nakon čega se biljna sirovina može oporabiti. Biljna sirovina se suši na sobnoj temperaturi te se skladišti [29].

## 2.3. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja

U ovom radu smo testirali antimikrobnu osjetljivost uzoraka eteričnih ulja. Test za ispitivanje je disk-difuzijski test. Korištene su bakterijske kulture *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* te kvasac *Candida lipolytica* koji su izolirani iz okoliša.

### 2.3.1. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* je pokretna, štapićasta, gram-pozitivna bakterija koja stvara spore otporne na toplinu (**Slika 12.**). Može se pronaći u tlu i vegetaciji s optimalnom temperaturom za rast od 25°C do 35°C. Ima sposobnost stvaranja i lučenja antibiotika. Antibiotici se luče tijekom sporulacije kako bi povećali šansu mikroorganizma za opstanak i kako bi ubili konkurentne mikroorganizme. *Bacillus subtilis* koristi se kao modelni organizam za proučavanje stvaranja endospora u bakterijama. Njegove endospore mogu podnijeti teške uvjete okoliša poput visokih temperatura i izlaganja UV zračenju [32].

*Bacillus subtilis* nije patogena bakterija ali može kontaminirati hranu te se smatra oportunističkim patogenima među imunološki ugroženim organizmima. Koristi se kao fungicid na sjemenkama, povrću i biljkama zbog svoje sposobnosti stvaranja antibiotika. Neki sojevi mogu proizvesti toksine za kukce te ih farme koriste za zaštitu usjeva [32].



**Slika 12.** *Bacillus subtilis* [33]

### 2.3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (**Slika 13.**) je gram-negativna bakterija koja često uzrokuje infekcije u bolnicama jer je oportunistička bakterija među imunološki ugroženim organizmima, pogotovo bolesnicima na respiratoru, s opeklinama i kronično iscrpljujućim

bolestima. *Pseudomonas aeruginosa* bakteriji odgovara vlažan okoliš, živi u vodi, tlu i vegetaciji [34]. Često se može naći u obalnim područjima i biljnim i životinjskim tkivima [35]. Može uzrokovati infekcije kože i mekih tkiva, infekcije dišnog sustava te urinoinfekcije [34]. Imaju dobru otpornost na antibiotike i dezinficijense. Optimalna temperatura rasta im je od 37 °C do 42 °C [35].



**Slika 13.** *Pseudomonas aeruginosa* [36].

### 2.3.3. *Escherichia coli*

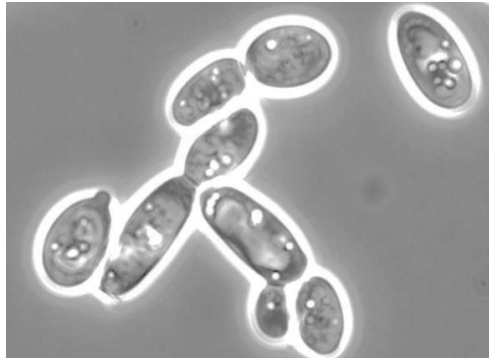
*Escherichia coli* (**Slika 14.**) je gram-negativna štapičasta bakterija kojoj je stanište u crijevima ljudi i životinja. U organizam dolazi putem hrane ili preko kontakta sa zaraženim predmetom. Može se nalaziti u onečišćenoj vodi i hrani, najviše na sirovom povrću i nedovoljno kuhanom mljevenom mesu. Bakterija je sastavni dio crijevne flore te je bitna za normalnu funkciju crijeva. Većina sorta *Escherichia coli* uzrokuje upalu mokraćnog sustava te može uzrokovati upalu bubrega. Također može izazvati teške grčeve u trbuhu, dijareju i povraćanje. Infekcije uzrokovane bakterijom se liječe primjenom antibiotika [37].



**Slika 14.** *Escherichia coli* [38].

#### **2.3.4. *Candida lipolytica***

*Candida lipolytica* (**Slika 15.**) je rijetki i patogeni kvasac koji može izazvati gljivičnu infekciju kod ljudi. Može ući u krvotok intravaskularnom kateterizacijom pogotovo kod imunokompromitiranih bolesnika ili kritično bolesnih pacijenata tijekom hospitalizacije. Raste pri temperaturi od 25 °C i 10 °C [39].



**Slika 15.** *Candida lipolytica* [40].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Cilj i provođenje eksperimenta

U ovom je radu cilj izolirati eterična ulja alepskog bora (*Pinus halepensis* Miller) iz porodice Borovki, te eterična ulja iz čempresa (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*), piramidalnog čempresa (*Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis*) i gluhača (*Juniperus phoenicea*) iz porodice Čempresovki. Provedena je karakterizacija uzoraka tankoslojnom kromatografijom, sustavom plinska kromatografija- spektrometrija masa te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom. Također je ispitan i antimikrobni utjecaj eteričnih ulja disk-difuzijskim testom.

##### **Plan rada eksperimentalnog dijela:**

- Osušiti biljni materijal te ga usitniti
- Ekstrahirati eterično ulje hidrodestilacijom
- Analizirati uzorke eteričnog ulja tankoslojnom kromatografijom
- Analizirati uzorke eteričnog ulja plinskom kromatografijom s masenom spektroskopijom
- Analizirati uzorke eteričnog ulja infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom
- Ispitati antimikrobni utjecaj uzoraka eteričnog ulja disk-difuzijskim testom

#### 3.2. Priprema biljnog materijala

Prije provođenja procesa biljni materijal se mora osušiti na zraku pri sobnoj temperaturi. Biljni materijal s otoka Brača ubran je u drugoj polovici kolovoza 2020. godine te se sušio do provođenja eksperimenta krajem rujna 2020. Biljni materijal iz Zagreba ubran je sredinom rujna 2020. godine te se sušio do provođenja eksperimenta početkom listopada 2020. godine. Kada se biljni materijal osušio, iglice se usitnjavaju do veličine od oko 1 cm.

Korišteno je 6 uzoraka koji se nalaze u **tablici 2**.

**Tablica 2.** Lokacija i vrste uzoraka korištenih u eksperimentu.

Lokacija	Vrsta	Oznaka uzorka
Brač	<i>Pinus halepensis</i> Miller	U1
	<i>Cupressus sempervirens</i> var. <i>horizontalis</i>	U2
	<i>Cupressus sempervirens</i> L. var. <i>pyramidalis</i>	U3, PČ
	<i>Juniperus phoenicea</i>	U4
Zagreb	<i>Cupressus sempervirens</i> L. var. <i>pyramidalis</i>	ZG

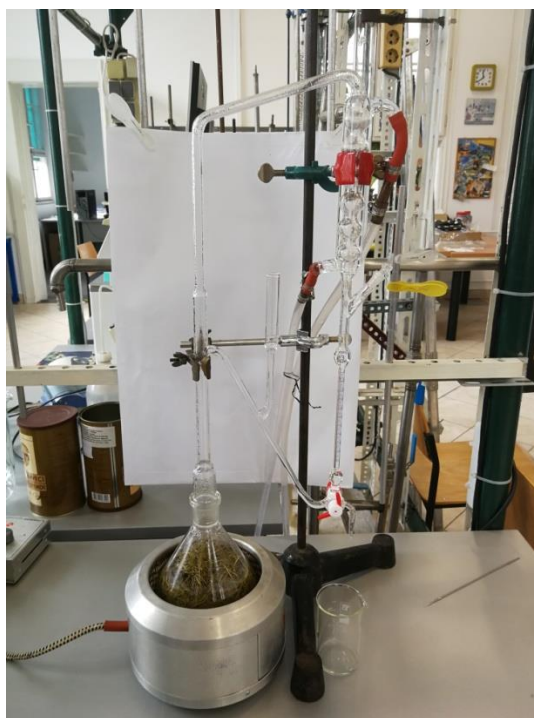
### 3.3. Ekstrakcija eteričnog ulja hidrodestilacijom

Osušen i usitnjen biljni materijal – iglice (**Slika 16.**), stavlja se u tikvicu s okruglim dnom. U tikvicu se unese oko 100 grama biljnog materijala i 650 mL destilirane vode uz dodatak kamenčića za vrenje da bi se izbjegla pojava zakašnjelog vrenja. Ekstrakcija eteričnog ulja hidrodestilacijom provodi se u aparaturi po Clavengeru (**Slika 17.**). Sadržaj u tikvici se zagrijavao električnim grijačem. Destilacija se provodila 2 ili 4 sata od pojave prve kapljice. Nakon destilacije očitava se volumen ekstrahiranog ulja na graduiranom dijelu aparature te se ulje ispušta u epruvetu u koju se naknadno doda malo bezvodnog natrijeva sulfata kako bi se ukloniu višak vode. Uzorci se čuvaju u hladnjaku.



**Slika 16.** Usitnjeni biljni materijal





Slika 17. Aparatura po Clavengeru za hidrodestilaciju

### 3.4. Metode karakterizacije

#### 3.4.1. Plinska kromatografija s masenom spektroskopijom (GC/MS)

Uzorci eteričnih ulja analizirani su plinskom kromatografijom s masenom spektroskopijom na uređaju Agilent 7890B/5977A (Slika 18.). Prije analize je uzorke potrebno pripremiti. Prvo se eterično ulje otapa u *n*-heksanu u omjeru 1:100 nakon čega se 1 mL uzorka injektira u split modu u omjeru 1:50. U sustavu je korišten helij kao plin nositelj uz protok od 1 mL/min. Komponente se separiraju u kapilarnoj koloni HP-5ms odnosno 5% fenil-metilpolisiloksan. Duljina kapilarne kolone je 30 cm te je unutarnji promjer 0,25 mm. Korištena debljina filma je 0,25 mm. Na početku analize temperatura kolone iznosila je 60 °C/1 min. Zagrijavanje se odvijalo 3 °C/min te se zagrijavalo do 200 °C nakon čega se pri toj temperaturi kolona zadržala 10 min. Odijeljenje komponente podvrgnute su analizi na masenom spektrometru, EI 70 eV, *m/z* 40-400. Za obradu rezultata koristio se računalni paket Agilent GC/MSD ChemStation verzija F.01.03. Komponente uzoraka eteričnih ulja identificirane su provođenjem usporedbe spektara masa u bazi NIST14, Wiley 9iHPCH 2205.



**Slika 18.** Plinski kromatograf sa spektrometrijom masa (GC-MS).

### **3.4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)**

Za provedbu analize infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom uzorci nisu zahtijevali prethodnu pripremu. Uzorci su snimljeni u rasponu od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$  na uređaju prikazanom na **slici 19.** (*Bruker Vertex 70.*).



**Slika 19.** Infracrveni spektrofotometar s Fourierovom transformacijom signala *Bruker Vertex 70, ZAKTN, FKIT*

### **3.4.3. Tankoslojna kromatografija (TLC)**

Prije provedbe tankoslojne kromatografije uzorci se moraju pripremiti. Otapa se 10  $\mu\text{L}$  ispitivanog eteričnog ulja u 1 mL *n*-heksana. Za pripravu poredbene otopine otapa se 10

$\mu\text{L}$  kariofilena,  $\alpha$ -pinena i tujona u 1 mL *n*-heksana. Kao nepokretna faza koristi se HPTLC pločica silikagela (Silikagel 60 F<sub>254</sub>), a kao pokretna faza koristi se smjesa etil-acetata i toluena u omjeru 5:95 V/V. Na pločicu se nanosi tanki sloj ispitivane otopine. Nanosi se 10  $\mu\text{L}$  u liniji te sustav stavlja u čašu s otapalom. Razvijanje se prekida kad je postignuta fronta otapala u visini do 8 cm nakon čega se pločica suši na zraku. Razvijena pločica se zatim poprskava s anisaldehyd reagensom (0,5 mL anisaldehyda pomiješano s 10 mL ledene octene kiseline, 85 mL metanola i 5 mL sulfatne kiseline). Pločica se zatim zagrijava u sušioniku u temperaturnom rasponu od 100 °C do 105 °C tijekom 5-10 minuta te se odmah promatra na dnevnom svjetlu.

### 3.5. Antimikrobna osjetljivost

U ovom radu testirana je antimikrobna osjetljivost uzoraka eteričnih ulja. Korištene su bakterijske kulture *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* te kvasac *Candida lipolytica*. Bakterijske kulture i kvasac su izolirani iz okoliša.

Prije testiranja antimikrobne osjetljivosti potrebno je pripremiti hranjive podloge. Hranjive podloge za uzgoj bakterija i kvasca pripremljene su u Erlenmeyer-ovim tikvicama. Za uzgoj bakterija koristi se podloga hranjivi agar, a za uzgoj kvasca malt agar. Hranjive podloge pripremaju se prateći upute proizvođača Biolife Manual, second edition, Ingraf, Italija 1991. Za provedbu testa osjetljivosti koristi se Mueller Hinton Broth podloga. Nakon što su podloge pripremljene potrebno ih je homogenizirati nakon čega se zagrijavaju do vrenja. Podloge se zatim steriliziraju u autoklavu 15 minuta pri uvjetima temperature od 120 °C i tlaka 1,1 atm.

Zatim se pripreme suspenzije bakterija odnosno kvasca. Bakterijske kulture *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* te kvasac *Candida lipolytica* uzgojene su na kosoj hranjivoj podlozi. Kulture su uzgojene dan prije testiranja antimikrobne osjetljivosti. Nakon pripreme stavljene su na inkubaciju u trajanju od 24 sata u uvjetima temperature od 37 °C za bakterijske kulture odnosno 28 °C za kulturu kvasca. Nakon inkubacije uzima se mala količina dobivene kulture sterilnom mikrobiološkom ušicom te se stavlja u 10 cm<sup>3</sup> sterilne fiziološke vode nakon čega se suspenzija homogenizira.

Antimikrobna osjetljivost ispituje se disk-difuzijskim testom. Disk-difuzijski test provodi se prema standardom postupku NCCLS *disc diffusion method* (CLSI, 2012). Pipetira

se 0,1 cm<sup>3</sup> pripremljenih suspenzija u Petrijevu zdjelicu na Mueller Hinton Broth podlogu. Nakon toga se suspenzija homogenizira štapićem po Drigalskom. Zatim se na podlogu postavljaju diskovi promjera 6 mm na koji se nanosi 0,02 cm<sup>3</sup>. Petrijeve zdjelice stavljaju se na inkubaciju. Petrijeve zdjelice koje sadrže bakterijsku kulturu inkubiraju se 24 sata pri temperaturi od 37 °C dok se Petrijevu zdjelicu koja sadrži kulturu kvasca inkubira 3 dana pri temperaturi od 28 °C. Kad je inkubacija gotova mjeri se zona inhibicije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Hidrodestilacija

Ekstrakcija eteričnih ulja iz iglica provodila se hidrodestilacijom u aparaturi po Clavengeru. Uzorci eteričnih ulja imaju svijetlo žutu boju. Dobiveni prinos eteričnih ulja ovisio je vremenu trajanja destilacije te o vrsti biljne sirovine.

Prinos uzoraka eteričnih ulja hidrodestilacijom prikazan je u **tablici 3.** te na **slici 20.**

**Tablica 3.** Prinos eteričnih ulja

Berba	Vrsta	Uzorak	m(uzorka), g	Vrijeme destilacije	Prinos, (mL/100 g)
Kolovoz 2020., otok Brač	Alepki bor, <i>Pinus halepensis</i> Miller	U1	100,62	2 h	0,63
	Čempres, <i>Cupressus sempervirens</i> var. <i>horizontalis</i>	U2	100,05	2 h	0,41
	Piramidalni čempres, <i>Cupressus sempervirens</i> L. var. <i>pyramidalis</i>	U3	100,32	2 h	0,26
	Piramidalni čempres, <i>Cupressus sempervirens</i> L. var. <i>pyramidalis</i>	PČ	100,22	4 h	0,41
	Gluhač, <i>Juniperus phoenicea</i>	U4	100,73	2 h	0,66
Rujan 2020., Zagreb	Piramidalni čempres, <i>Cupressus sempervirens</i> L. var. <i>pyramidalis</i>	ZG	101,18	4 h	0,70

Iz **tablice 3.** vidljivo je da najveći prinos eteričnog ulja nakon 2 sata destilacije ima gluhač, *Juniperus phoenicea*, dok destilacijom od 4 sata veći prinos ima čempres, *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* s područja Zagreba nego ista vrsta s područja Brača. Duljim vremenom ekstrakcije dobiva se za 57,6 % veći prinos eteričnog ulja piramidalnog čempresa. Usporede li se podaci o prinosu eteričnog ulja piramidalnog čempresa s dvije lokacije uočava se da je veći prinos dobiven iz biljnog materijala prikupljenog u Zagrebu (za isto vrijeme trajanja ekstrakcije). Kako je vrijeme prikupljanja uzoraka (kraj kolovoza, odnosno početak rujna) blisko, može se zaključiti da na prinos utječu lokalni geografski i okolišni uvjeti. Prinos eteričnog ulja obje vrste čempresa nalazi se u rasponu literaturnih podataka. U većini objavljenih radova listovi čempresa nisu osušeni već se ulje ekstrahiralo iz svježih listova.

Osim toga vrijeme trajanja ekstrakcije također se razlikuje. Tako su Asgary i suradnici dobili prinos od 0,67 % nakon 4 sata hidroddestilacije [41]. Ucar i suradnici, utvrdili su da vrsta čempresa (*var. horizontalis* *var. pyramidalis*) ne utječu u znatnoj mjeri na prinos (0,25-0,50 %; ekstrakcija iz svježih listova tijekom 35-40 minuta) [28]. Dobiveni prinos gluhača od 0,56% odgovara rasponu prinosa gluhača iz ostalih zemalja: Portugal (0,41%), Španjolska (0,66%), Grčka (0,58%), Egipat (1,96%) te Maroko (1,62%) [42]. Autori su ekstrakciju eteričnog ulja iz osušenih listova gluhača provodili 3 sata. Eterično ulje alepskog bora također se u većini slučajeva ekstrahira iz svježih listova a ekstrakcija traje 3 sata. Prinos alepskog bora u rasponu je prinosa objavljenih u literaturi (0,30 – 0,87%) [43,44].

Dobiveni rezultati potvrđuju da na prinos eteričnog ulja utječu porijeklo uzoraka, vrijeme branja uzorka (godišnje doba), metoda pripreme uzoraka, metoda ekstrakcije te vrijeme trajanja procesa. Porijeklo uzorka vezano je za lokalitet te lokalne okolišne uvjete (vrsta tla, klima). Ekstrakcija se može provoditi iz svježeg ili osušenog biljnog materijala koji može ili ne mora biti usitnjen. Prethodnom maceracijom uzoraka moguće je dobiti veći prinos ulja kojem će se razlikovati i kemijski sastav [41]. Usporedba podataka otežana je jer u mnogim radovima nije naglašeno kako se prinos računao; s obzirom na suhu ili svježu tvar (maseni udio, omjer volumena imase tvari).

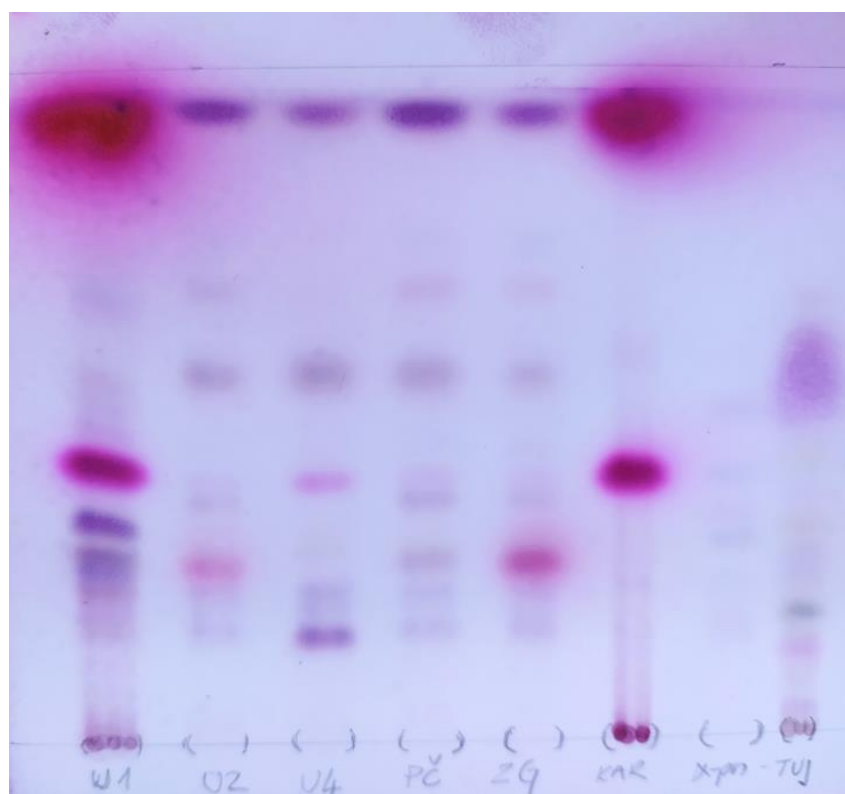


**Slika 20.** Prinos eteričnog ulja vrste Alepski bor, *Pinus halepensis* Miller (U1) - lijevo i vrste Čempres, *Cupressus sempervirens var. horizontalis*, lokacija Zagreb (ZG) – desno

## 4.2. Kemijski sastav

### 4.2.1. Tankoslojna kromatografija (TLC)

Tankoslojnom kromatografijom (Slika 21.) istražena je prisutnost kariofilena,  $\alpha$ -pinena i tujona u ekstrahiranim eteričnim uljima alepskog bora, čempresa i gluhača. Kromatogram je prikazan na slici 16. U uzorcima eteričnih ulja alepskog bora i gluhača potvrđena je prisutnost kariofilena, pri čemu se može zaključiti da je koncentracija kariofilena znatno veća u eteričnom ulju alepskog bora.  $\alpha$ -pinen nije identificiran u niti jednom uzorku (vjerojatno zbog slabije razvijenog obojenja). Kromatogram također upućuje na eventualno malu koncentraciju tujona u uzorcima eteričnih ulja čempresa i gluhača.



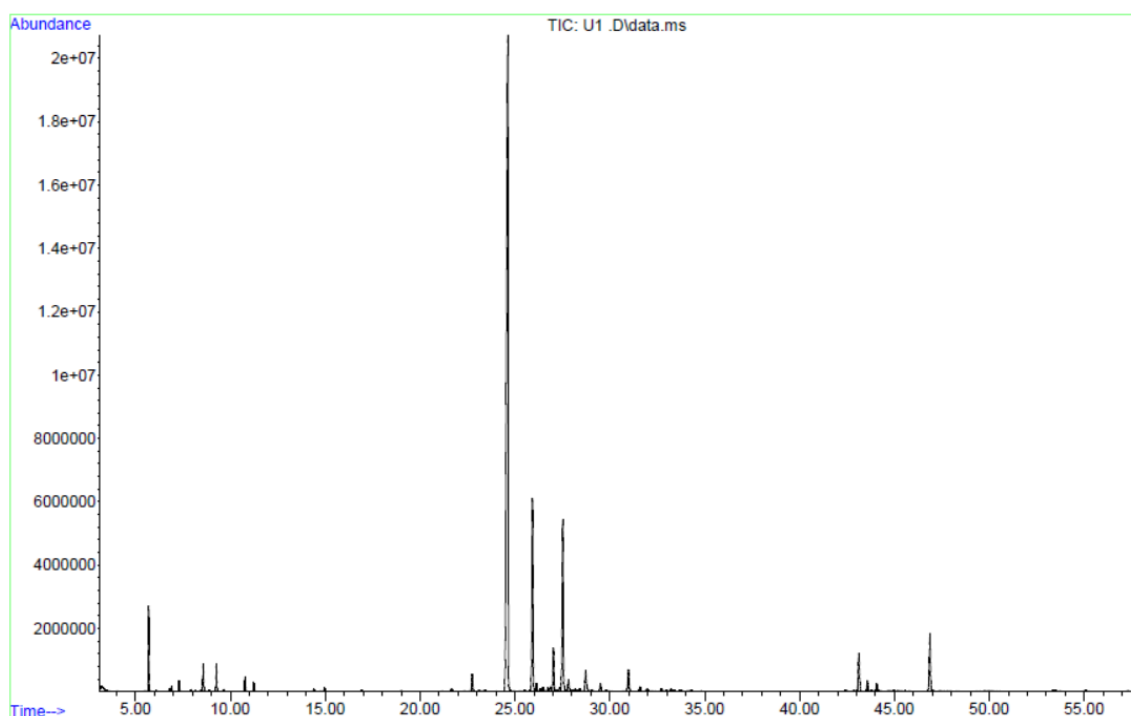
**Slika 21.** TLC analiza uzoraka U1 – alepski bor (*Pinus halepensis* Miller), U2 – čempres (*Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis*), U4 – gluhač (*Juniperus phoenicea*), PČ – piramidalni čempres (*Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis*), ZG – čempres (*Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis*, lokacija Zagreb)

## 4.2.2. Plinska kromatografija s masenom spektroskopijom (GC/MS)

GC/MS metodom određen je kemijski sastav eteričnih ulja ekstrahiranih metodom po Clavengeru. Dobiveni su kromatogrami prikazani na slikama 22.- 26., a kemijski sastav ulja (sastavnice udjela većeg od 1 %) u tablicama 4.,6.,7.,8. i 10.

### 4.2.2.1. Kemijski sastav eteričnog ulja alepskog bora

Na slici 22. prikazan je kromatogram eteričnog ulja alepskog bora a u tablici 4. dan je kemijski sastav ulja. Najzastupljenije komponente eteričnog ulja ekstrahiranog iz iglica alepskog bora su  $\beta$ -kariofilen i  $\alpha$ -humulen. Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim, tablica 5., može se zaključiti da na sastav eteričnog ulja u velikoj mjeri utječe geografsko porijeklo bora kao i vrijeme branja. Eterično ulje alepskog bora s otoka Brača, čije su iglice prikupljene u drugoj polovici kolovoza, sadrži znatno veći udio  $\beta$ -kariofilena i  $\alpha$ -humulena. Obzirom da su neke komponente eteričnih ulja hlapljive, sastav eteričnog ulja ekstrahiranog iz biljnog materijala branog tijekom različitih godišnjih doba može se u velikoj mjeri razlikovati.



Slika 22. Kromatogram uzorka eteričnog ulja alepskog bora, *Pinus halepensis* Miller (U1).



**Tablica 4.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja alepskog bora, *Pinus halepensis* Miller (U1).

Sastavnica	Vrijeme zadržavanja	Postotak
$\alpha$ -pinen	5,689	2,792
limonen	8,564	1,112
$\beta$ -ocimen	9,262	1,109
kariofilen E	24,620	<b>54,640</b>
$\alpha$ -humulen	25,921	<b>11,187</b>
germakren D	27,023	2,462
fenil-etil-3-metil-butanoat	27,517	9,964
$\delta$ -kadinen	28,728	1,420
kariofilenoksid	30,978	1,345
cembren	43,131	2,375
cembren (steroizomer)*	46,873	3,552

**Tablica 5.** Literaturni rezultati za kemijski sastav uzorka eteričnog ulja alepskog bora.

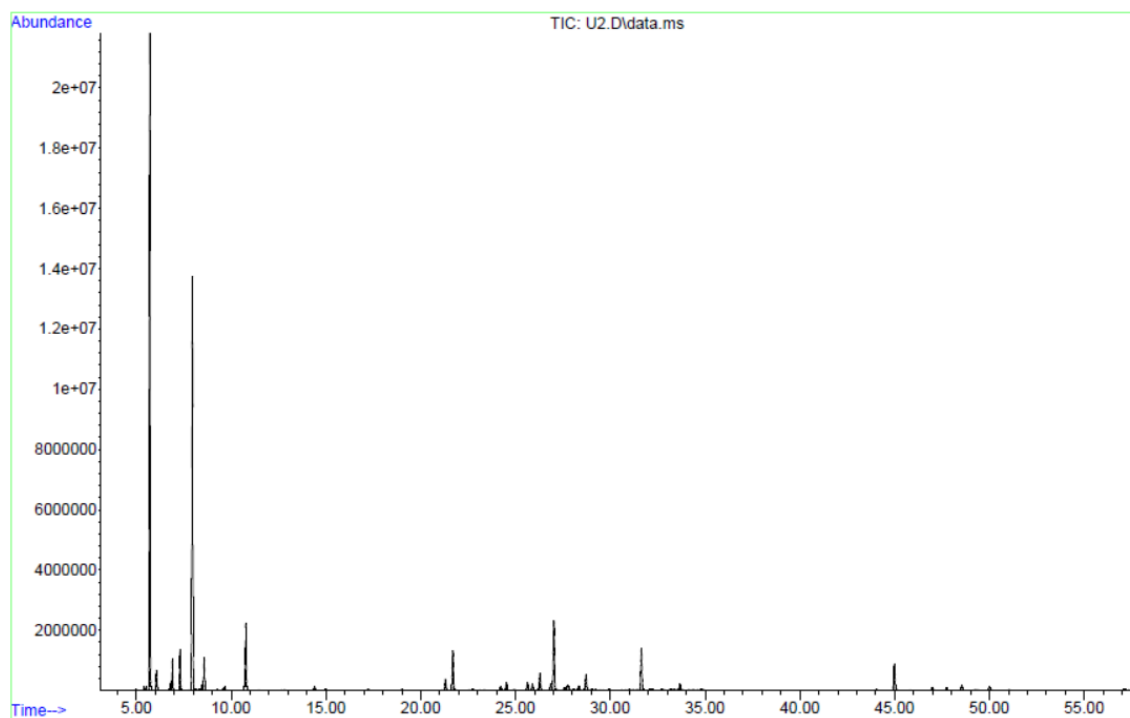
$\beta$ -kariofilen	$\alpha$ -humulen	literatura	porijeklo
33,9	5,2	Amri i suradnici, 2013 [43]	Tunis, veljača
16,6-28,9	2,85-5,20	Hamrouni i suradnici, 2015 [44]	Tunis, veljača
40,31	7,92	Dob i suradnici, 2005 [45]	Alžir, svibanj
5,21-6,20	2,0-3,12	Elkady i suradnici, 2021 [46]	Egipat, travanj

#### 4.2.2.2. Kemijski sastav eteričnog ulja čempresa

Na **slikama 23.-25.** prikazani su kromatogrami eteričnih ulja ekstrahiranih iz listova čempresa i piramidalnog čempresa s otoka Brača te Zagreba. Kemijski sastav eteričnih ulja dan je u **tablicama 6.- 8.**

Najzastupljenije komponente eteričnog ulja ekstrahiranog iz iglica čempresa (U2) i piramidalnog čempresa (PČ) s lokacije Brača su  $\alpha$ -pinen i  $\delta$ -karen. Najzastupljenije komponente eteričnog ulja iz iglica piramidalnog čempresa (ZG) s lokacije Zagreb su  $\alpha$ -pinen,  $\delta$ -karen i  $\alpha$ -cedrol. Može se zaključiti kako piramidalni čempres iz Zagreba ima veći udio  $\alpha$ -pinena te  $\alpha$ -cedrola, dok piramidalni čempres sa Brača ima veći udio  $\delta$ -karena. S

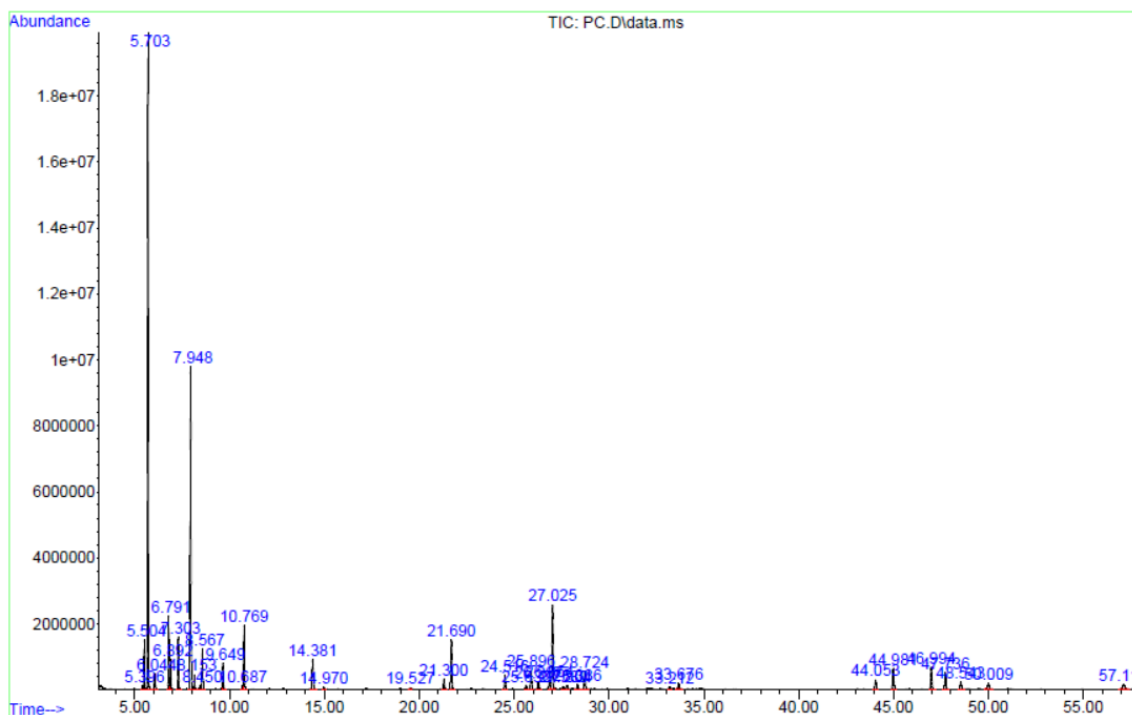
obzirom da je metoda pripreve uzoraka i ekstrakcije bila jednaka očito je da na sastav utječe geografsko porijeklo.



**Slika 23.** Kromatogram uzorka eteričnog ulja čempresa, *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* (U2)

**Tablica 6.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja čempresa, *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* (U2).

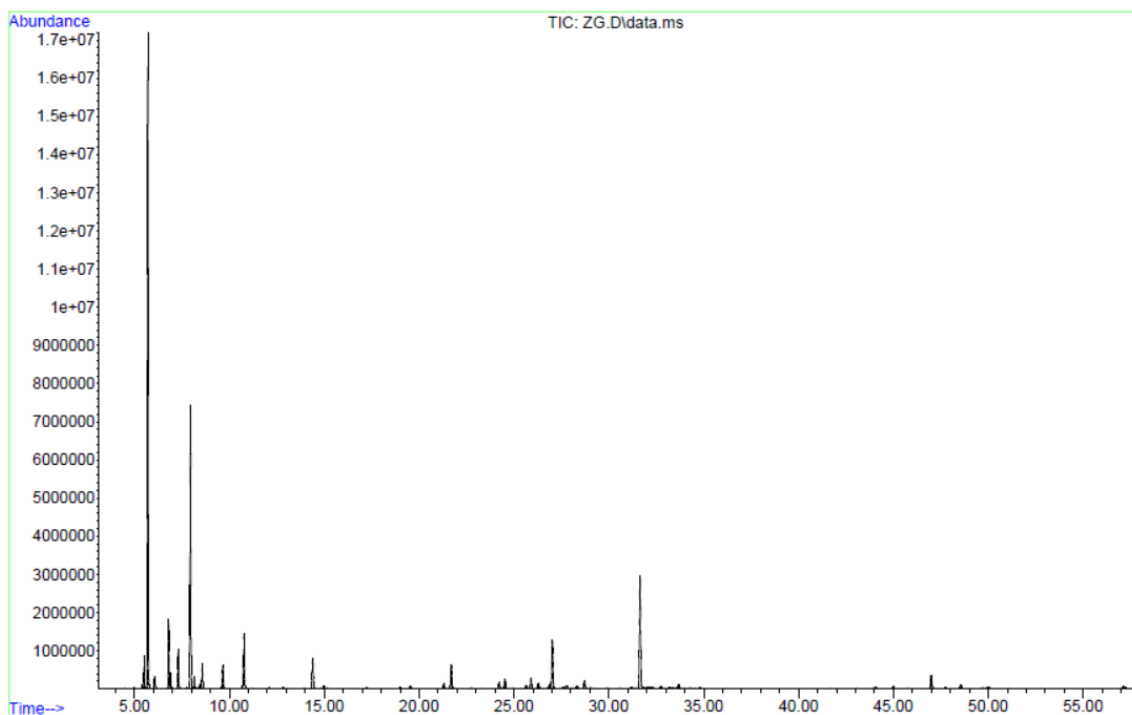
Sastavnica	Vrijeme zadržavanja	Postotak
$\alpha$ -pinen	5,709	<b>36,434</b>
$\alpha$ -fenhen	6,048	1,192
$\beta$ -pinen	6,896	1,652
mircen	7,306	2,189
$\delta$ -karen	7,958	<b>25,535</b>
D-limonen	8,571	2,131
terpinolen	10,773	4,504
$\alpha$ -terpenilpropionat	21,689	3,165
muurola 4 (14),5-dien	26,289	1,453
germakren D	27,023	5,695
cedrol	31,639	3,609



**Slika 24.** Kromatogram uzorka eteričnog ulja piramidalnog čempresa, *Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis* (PČ) – lokacija Brač.

**Tablica 7.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja piramidalnog čempresa, *Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis* (PČ) – lokacija Brač.

Sastavnica	Vrijeme zadržavanja	Postotak
felandren	5,504	2,147
$\alpha$ -pinen	5,703	<b>32,817</b>
sabinen	6,791	3,594
$\beta$ -pinen	6,892	1,531
mircen	7,303	2,660
$\delta$ -karen	7,948	<b>18,065</b>
limonen	8,567	2,382
$\Gamma$ -terpinen	9,649	1,551
terpinolen	10,769	4,019
terpinen-4-ol	14,381	2,125
$\alpha$ -terpinil-propionat	21,690	3,722
kariofilen E	24,516	1,081
$\alpha$ -humulen	25,896	1,481
germakren D	27,025	6,745
muurola-3,5 -dien	28,724	1,429
abietatrien	46,994	1,819
abietadien	47,736	1,396



**Slika 25.** Kromatogram uzorka eteričnog ulja piramidalnog čempresa, *Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis* (ZG) – lokacija Zagreb.

**Tablica 8.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja piramidalnog čempresa, *Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis* (ZG) – lokacija Zagreb.

Sastavnica	Vrijeme zadržavanja	Postotak
felandren	5,508	1,659
$\alpha$ -pinen	5,704	<b>36,863</b>
sabinen	6,795	3,914
mircen	7,308	2,319
$\delta$ -karen	7,947	<b>17,942</b>
limonen	8,570	1,684
$\Gamma$ -terpinen	9,654	1,597
terpinolen	10,772	3,976
terpinen-4-ol	14,385	2,529
$\alpha$ -terpinil-propionat	21,691	2,041
germakren D	27,020	4,190
$\alpha$ -cedrol	31,648	<b>10,546</b>

**Tablica 9.** Literaturni rezultati za kemijski sastav uzoraka eteričnog ulja čempresa, H; *var. horizontalis*; V: *var. pyramidalis*.

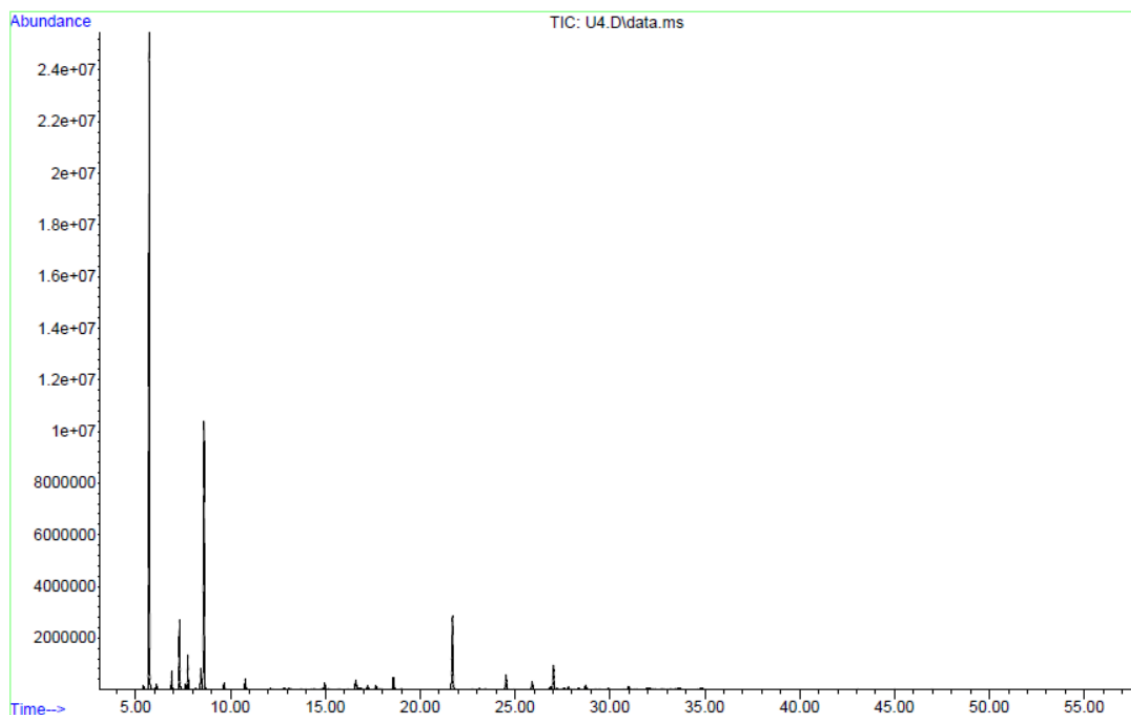
$\alpha$ -pinen	$\delta$ -karen	$\alpha$ -cedrol	literatura	porijeklo
H: 36,6-61,9 V: 36,1-75,2	H: 2,32-24,0 V: 0,04-26,8	H: 0,02-3,54 V: 0-5,79	Ucar i suradnici, 2007. [47]	Turska, studeni i prosinac
H: 21,4	H: 16,0	3,3	Hassanzadeh Khayyat i suradnici, 2006 [48]	Iran
37,14	19,67	1,69	Boukhris i suradnici, 2012[49]	Tunis, travanj
27,8-65,7	0,2-30,1	0-7,6	Adams i suradnici, 2017 [50]	Kalifornija i Turska
60,5	0,2	8,3	Mazari i suradnici, 2010 [51]	Alžir, studeni

Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim, **tablica 9.**, može se zaključiti da na sastav eteričnog ulja u velikoj mjeri osim geografskog porijekla čempresa utječe i vrijeme branja. U eteričnim uljima uzoraka čempresa (horizontalni i vertikalni) s otoka Brača, čije su iglice prikupljene u drugoj polovici kolovoza, koncentracije  $\alpha$ -pinena,  $\delta$ -karena i  $\alpha$ -cedrola nalaze se u rasponu koncentracija objavljenim u literaturi. Eterično ulje piramidalnog čempresa (ZG) iz Zagreba, čije su iglice prikupljene sredinom rujna, također sadrži sličan udio  $\alpha$ -pinena i  $\delta$ -karena je u očekivanom rasponu, a udio  $\alpha$ -cedrola je veći.

#### 4.2.2.3. Kemijski sastav eteričnog ulja gluhača

Na **slici 26.** prikazan je kromatogram a u **tablici 10.** dan je kemijski sastav eteričnog ulja ekstrahiranog iz listova gluhača. Najzastupljenije komponente eteričnog ulja ekstrahiranog iz listova gluhača su  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -felandren i germakren D. Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim, **tablica 11.**, može se zaključiti da na sastav eteričnog ulja u velikoj mjeri utječe geografsko porijeklo gluhača kao i vrijeme branja. Na primjer, eterično ulje ekstrahirano iz listova gluhača prikupljenih u Maroku i Tunisu tijekom proljeća i jeseni često ne sadrži  $\beta$ -felandren i germakren D.

Eterično ulje gluhača (U4) s otoka Brača, čiji su listovi prikupljeni u drugoj polovici kolovoza, sadrži udio  $\alpha$ -pinena i  $\beta$ -felandren sličan gornjim granicama literaturnih podataka dok je udio germakrena D znatno veći.



Slika 26. Kromatogram uzorka eteričnog ulja gluhača, *Juniperus phoenicea* (U4).

Tablica 10. Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja gluhača, *Juniperus phoenicea* (U4).

Sastavnica	Vrijemezadržavanja	Postotak
$\alpha$ -pinen	5,717	<b>49,083</b>
$\beta$ -pinen	6,898	1,239
mircen	7,309	4,637
$\alpha$ -felandren	7,750	2,466
cimen	8,431	1,585
$\beta$ -felandren	8,600	<b>21,654</b>
isopulegil-acetat	18,587	1,230
terpinil-propionat	21,699	7,309
kariofilen E	24,518	1,463
germakren D	27,019	<b>27,019</b>

**Tablica 11.** Literaturni rezultati za kemijski sastav uzoraka eteričnog ulja gluhača.

$\alpha$ -pinen	$\beta$ -felandren	Germakren D	literatura	porijeklo
35,46-38,2	-	-	Achak i suradnici, 2008 [52]	Maroko i Tunis, ožujak
49,15	-	0,68	Derwich i suradnici, 2010 [42]	Maroko, ožujak
24,9	24,4	2,4	Ait-Ouazzou i suradnici, 2012 [53]	Maroko, svibanj i lipanj
36,5-56	0,8-7,3	1,4-1,6	Ramdani i suradnici, 2013 [54]	Alžir, listopad
55,7	-	-	Ennajar i suradnici, 2009 [55]	Tunis, listopad
31,1-59,5	4,9-23,8	0,2-0,9	Rezzi i suradnici, 2001 [56]	Korzika, svibanj do rujan
27,92	17,67	0,22	El Hajjouji i suradnici, 2019 [57]	Maroko

#### 4.2.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

Uzorcima ekstrahiranih eteričnih ulja snimljeni su FTIR spektri te su uspoređeni s FTIR spektrima najzastupljenijih sastavnica. U **prilogu** se nalaze **slike 27.-33.** FTIR spektara najzastupljenijih sastavnica eteričnih ulja. Na **slikama 34.-37.** prikazani su FTIR spektri eteričnih ulja i najzastupljenijih sastavnica u pojedinom ulju.

FTIR spektri eteričnog ulja iglica alepskog bora te najzastupljenijih sastavnica prikazani su na **slici 34.** Na spektru eteričnog ulja mogu se uočiti pikovi karakteristični za:

- $\alpha$ -humulen: 1633, 1448, 1382, 1366, 967  $\text{cm}^{-1}$  [61]
- $\beta$ -kariofilen: 1633, 1448, 1382, 1366, 885  $\text{cm}^{-1}$  [62].

FTIR spektri eteričnog ulja iglica čempresa i piramidalnog čempresa te najzastupljenijih sastavnica prikazani su na **slici 35.** Na spektru eteričnog ulja mogu se uočiti pikovi karakteristični za (H; *var. horizontalis*; V: *var. pyramidalis*):

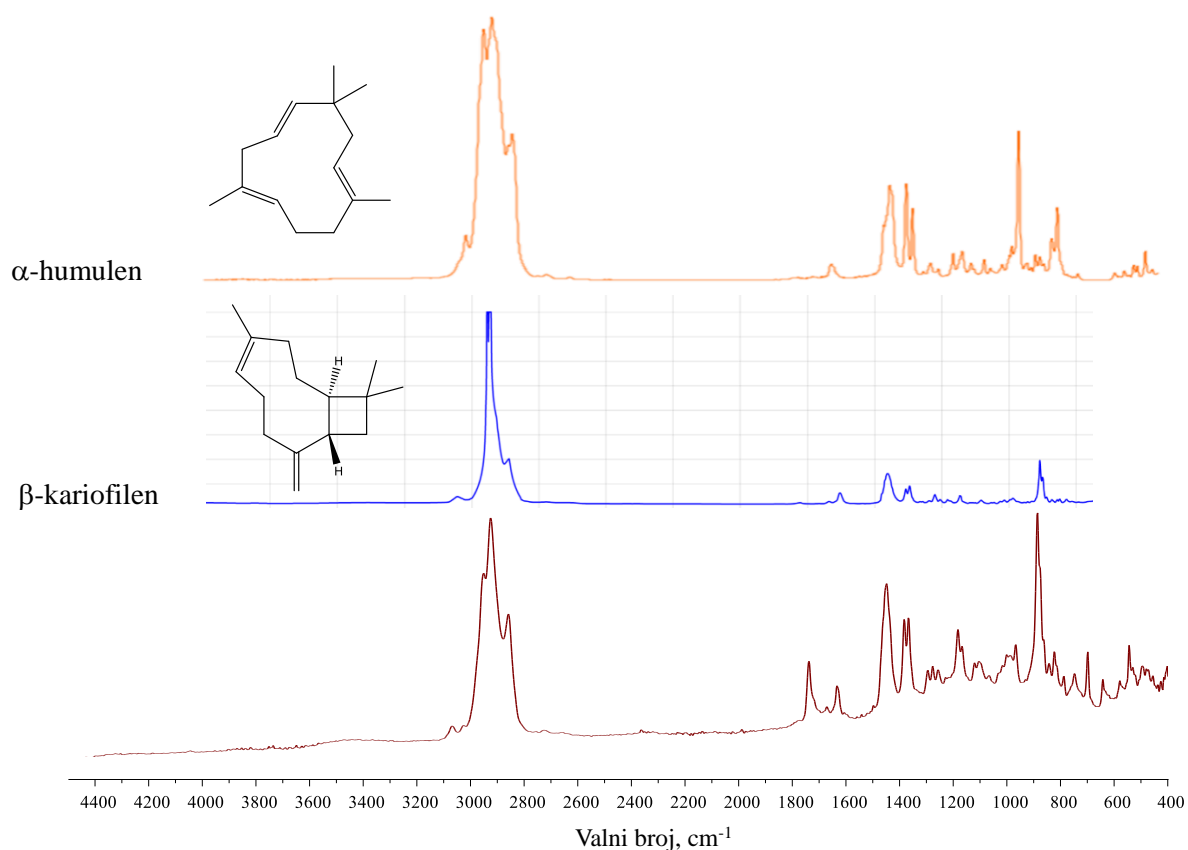
- $\alpha$ -pinen: (H: 36,43 %; P: 32,82 %): 786, 886, 1365, 1375, 1445, 1465  $\text{cm}^{-1}$
- $\delta$ -karen: (H: 25,54 %; P: 18,07 %): 786, 1375, 1445  $\text{cm}^{-1}$

FTIR spektri eteričnog ulja iglica kontinentalnog piramidalnog čempresa iz Zagreba te najzastupljenijih sastavnica prikazani su na **slici 36**. Na spektru eteričnog ulja mogu se uočiti pikovi karakteristični za:

- $\alpha$ -cedrol (10,55%): 1112, 1365, 1465  $\text{cm}^{-1}$
- $\delta$ -karen (17,94 %): 786, 972, 1112, 1365, 1446, 1653  $\text{cm}^{-1}$
- $\alpha$ -pinen (36,86 %): 786, 886, 1365, 1375, 1446, 1465  $\text{cm}^{-1}$

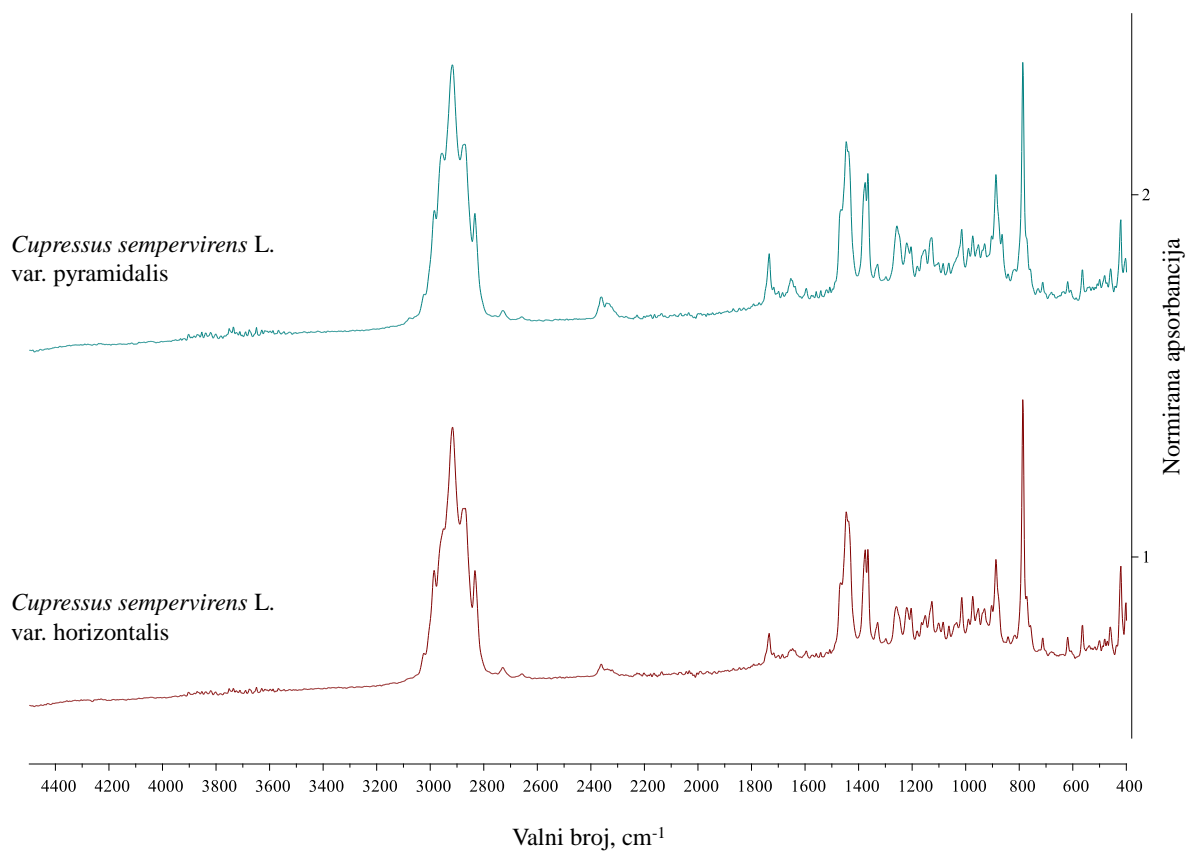
FTIR spektri eteričnog ulja iglica gluhača te najzastupljenijih sastavnica prikazani su na **slici 37**. Na spektru eteričnog ulja mogu se uočiti pikovi karakteristični za:

- Germakren D (27,02 %): 877, 1365, 1446, 1642  $\text{cm}^{-1}$
- $\beta$ -felandren (21,65 %): 877, 1365, 1380, 1446, 1467, 1734  $\text{cm}^{-1}$
- $\alpha$ -pinen (49,08 %): 787, 1365, 1380, 1446, 1467, 1596  $\text{cm}^{-1}$

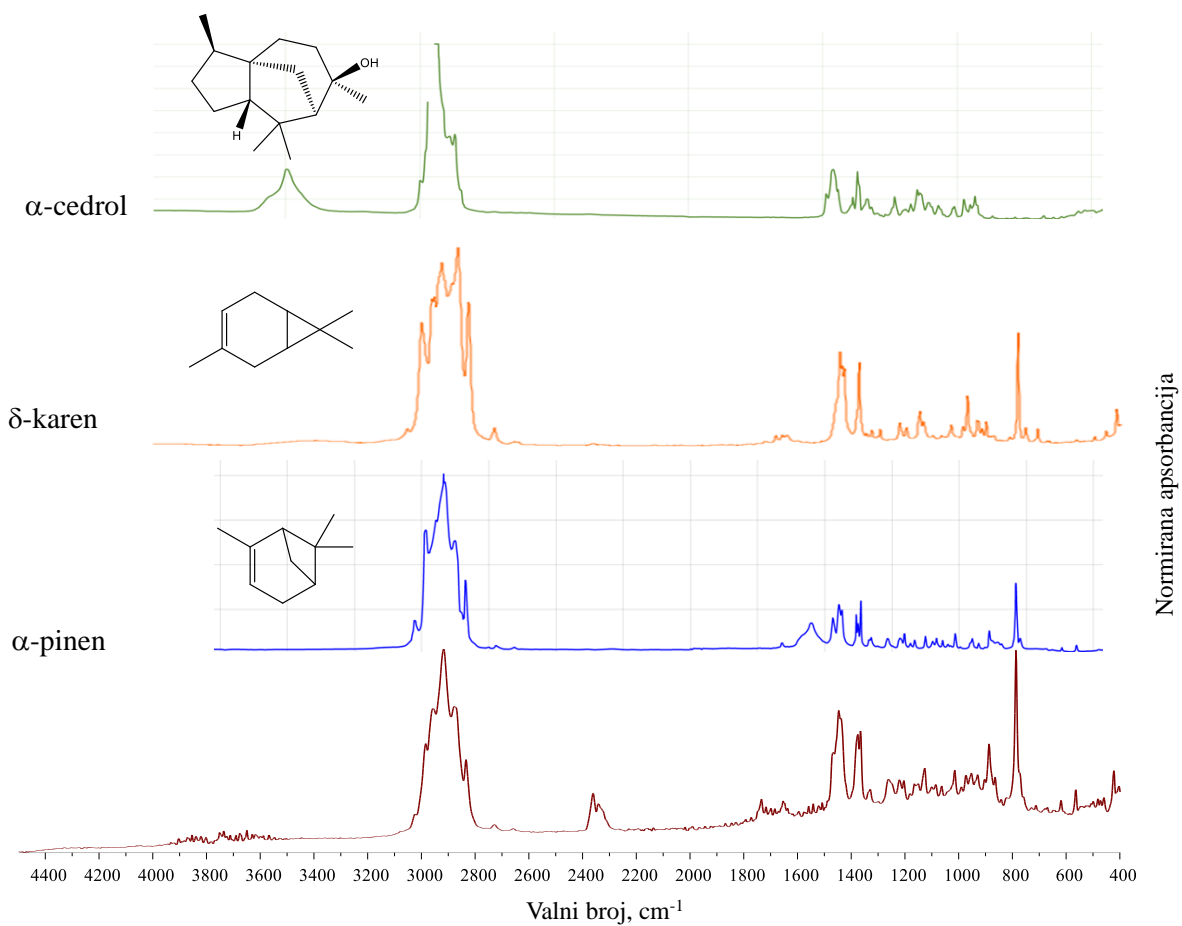


**Slika 34.** FTIR spektar eteričnog ulja alepskog bora (*Pinus halepensis* Miller) i najzastupljenijih sastavnica

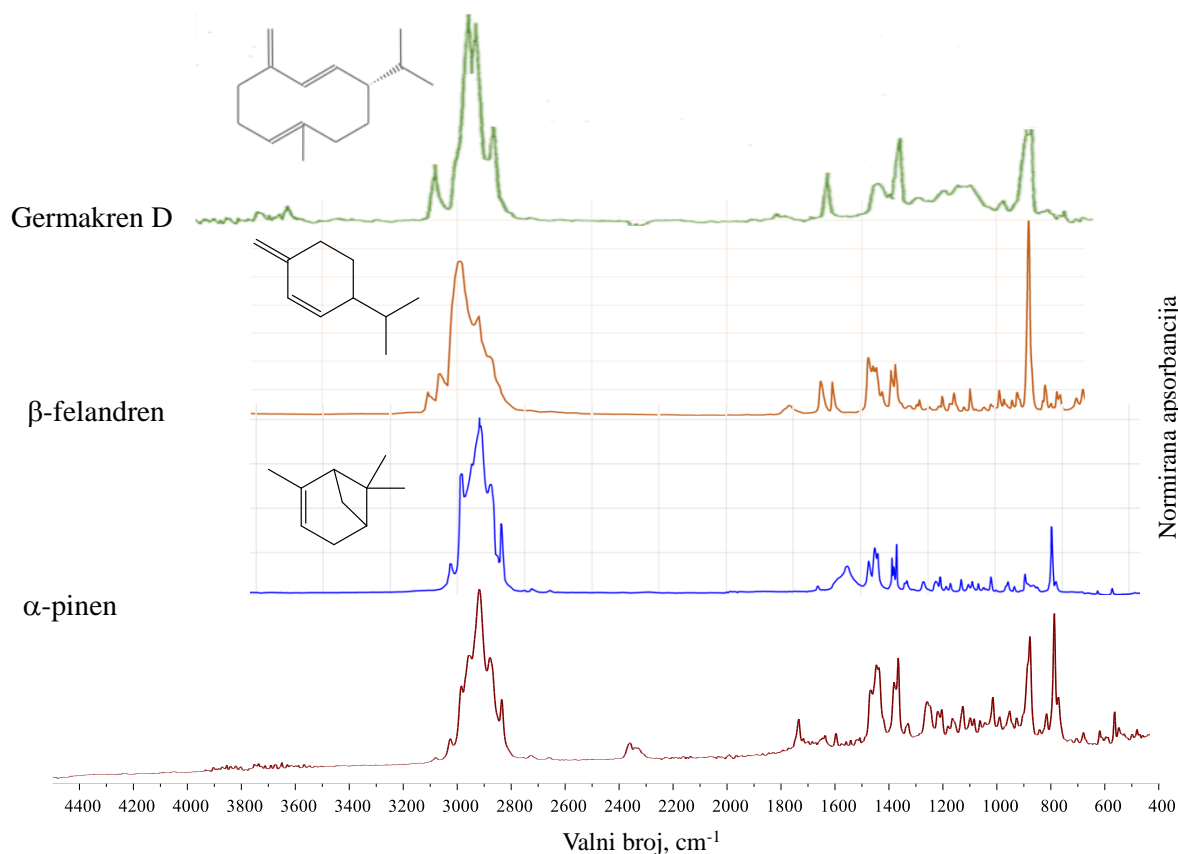




**Slika 35.** FTIR spektar eteričnog ulja čempresa (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*) i piramidalni čempres (*Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis*), lokacija Brač



**Slika 36.** FTIR spektar eteričnog ulja piramidalog čempresa (*Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis*), lokacija Zagreb i najzastupljenijih sastavnica



**Slika 37.** FTIR spektar eteričnog ulja gluhača (*Juniperus phoenicea*) i najzastupljenijih sastavnica

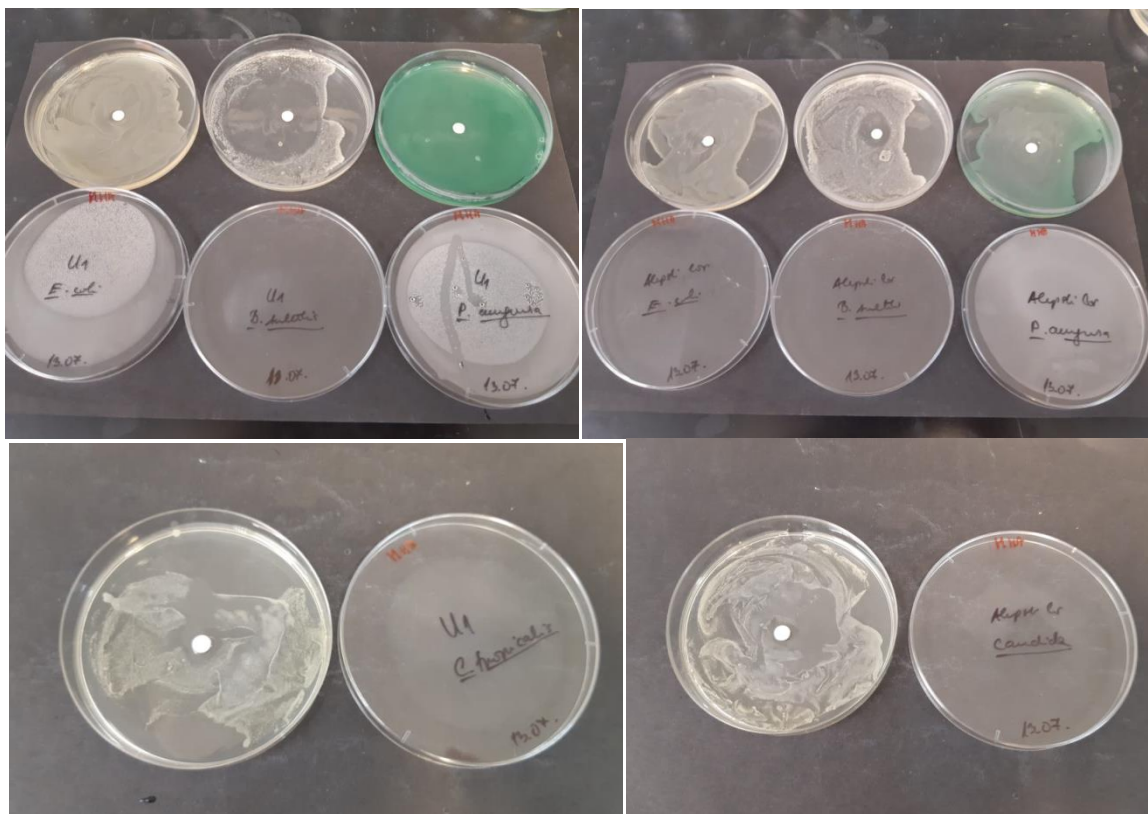
FTIR analiza potvrdila je prisutstvo najzastupljenijih sastavnica eteričnih ulja prethodno identificiranih GC-MS analizom.

#### 4.2.4. Antimikrobna osjetljivost

Na **slikama 38.-43.** prikazan je utjecaj eteričnih ulja na bakterijske kulture *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa* te kvasac *Candida lipolytica*. Prikaz izmjerenih zona inhibicije u cm dan je u **tablici 12.**

Antimikrobna aktivnost iščitava se iz veličine zone inhibicije koja je izražena promjerom inhibicijske zone u cm. Ispitani uzorci čempresa, gluhača i alepskog bora pokazuju inhibirajući učinak na kulturu kvasca *Candida lipolytica* dok piramidalni čempres sa Brača i iz Zagreba ne pokazuju inhibirajući učinak. Također, može se vidjeti da svih sedam

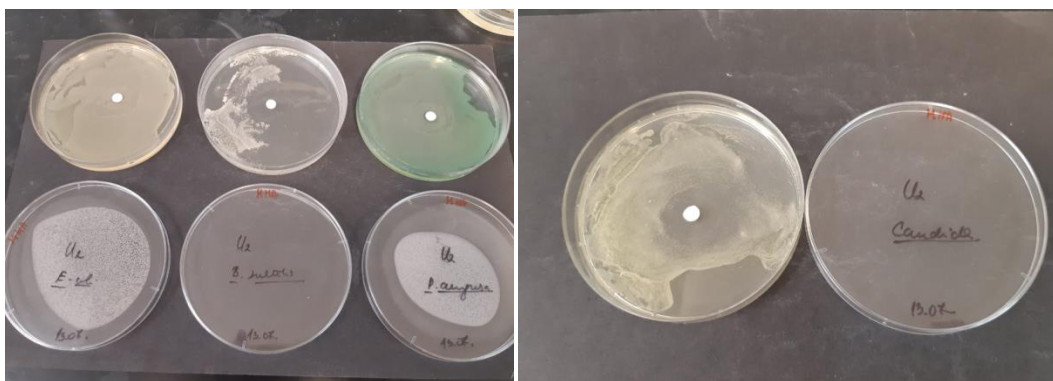
analiziranih uzoraka pokazuju inhibirajući utjecaj prema gram-pozitivnoj bakteriji *B. subtilis*. Piramidalni čempres pokazuje nešto veći inhibirajući utjecaj nego ostali ispitani uzorci. Ni jedan analizirani uzorak nije pokazao inhibicijsko djelovanje prema gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*.



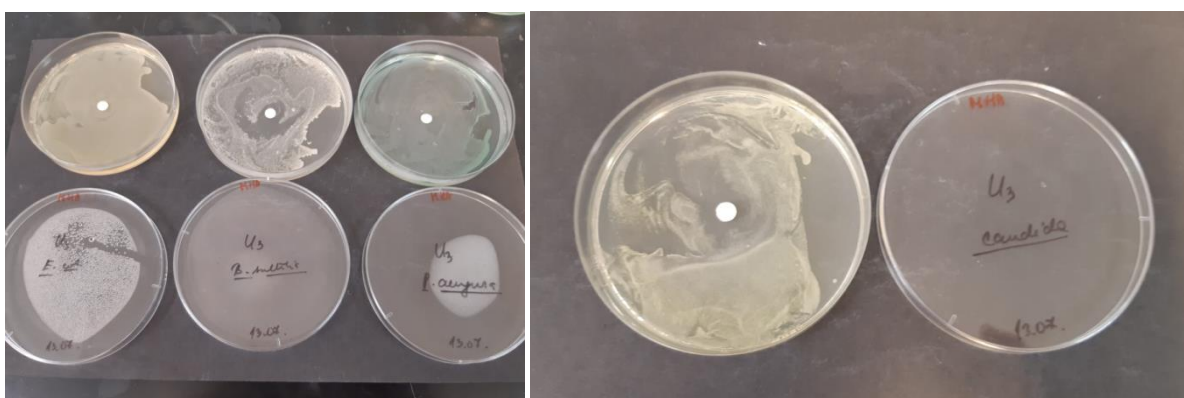
**Slika 38.** Utjecaj eteričnih ulja vrste alepskog bora, *Pinus halepensis* Miller (U1 i alepski bor) na bakterijske kulture *E. coli*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* te na kvasac *C. lipolytica*.

Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja alepskog bora slaže se s literaturnim rezultatima Abi-Ayada i suradnika, [63] koji su utvrdili danema inhibirajućeg učinka na gram-negativne bakterije. Fekiha i suradnici [27] utvrdili su da eterično ulje alepskog borapokazuje inhibirajući učinak prema *P. aeruginosa*, ali da ne ihibira *E. coli*. Inhibirajući učinak na gram-pozitivne bakterije *B. subtilis* slaže se s literaturnim rezultatima Bouyahya-e i suradnika [64]. Hamrounii suradnici [44] te Amri i suradnici [43] utvrdili su da eterično ulje alepskog djeluje antifugalno te da su glavne komponente odgovorne za to  $\alpha$ -pinen i  $\beta$ -kariofilen. Kako je u uzorku eteričnog ulja alepskog bora ekstrahiranom u ovom radu udio  $\alpha$ -pinena mali, moguće je da kombinacija ostalih komponenata prisutnih u manjoj koncentriciji

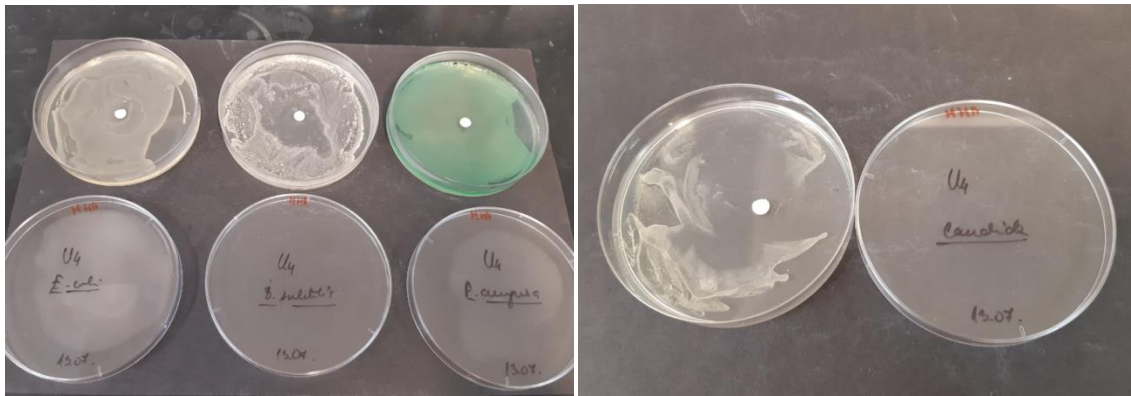
imaju važnu ulogu u antibakterijskom i antifungalnom djelovanju [41,42]. Antimikrobnu aktivnost može se pripisati velikom udjelu komponenti  $\beta$ -kariofilena i  $\alpha$ -humulena u uzorku koji djeluju antibakterijski i antifungalno. Inhibicijsko djelovanje eteričnog ulja na gram-pozitivne bakterije objašnjava se nedostatkom lipopolisaharidne membrane (karakteristične za gram-negativne bakterije) čime je omogućen direktan kontakt i difuzija hidrofobnih komponenata u bakteriju. Što se tiče inhibicijskog djelovanja na kvasac, komponente eteričnog ulja čine staničnu membranu propusnom te a sličan način omogućavaju difuziju komponenata eteričnog ulja.



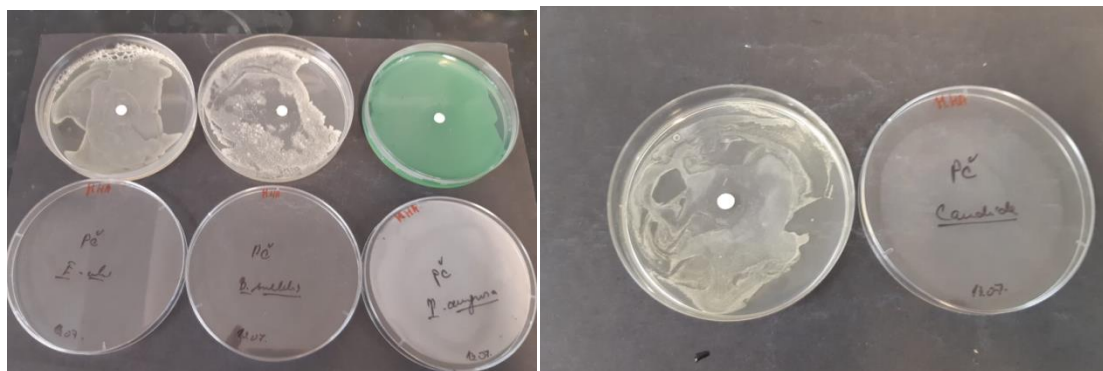
**Slika 39.** Utjecaj eteričnih ulja vrste čempres, *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* (U2) na bakterijske kulture *E. coli*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* te na kvasac *C. lipolytica*.



**Slika 40.** Utjecaj eteričnih ulja vrste piramidalni čempres, *Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis* (U3) – lokacija Brač na bakterijske kulture *E. coli*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* te na kvasac *C. lipolytica*.

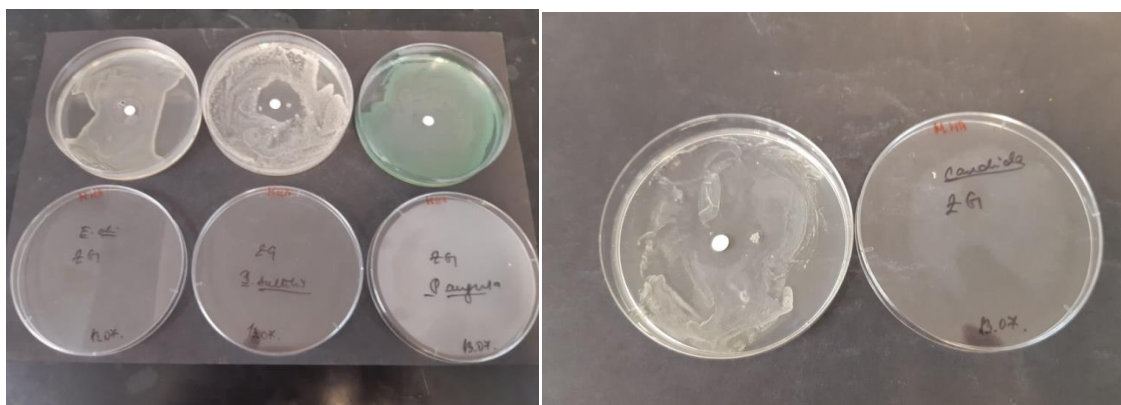


**Slika 41.** Utjecaj eteričnih ulja vrste gluháč, *Juniperus phoenicea* (U4) na bakterijske kulture *E. coli*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* te na kvasac *C. lipolytica*.



**Slika 42.** Utjecaj eteričnih ulja vrste piramidalni čempres, *Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis* (PČ) – lokacija Brač na bakterijske kulture *E. coli*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* te na kvasac *C. lipolytica*.

Pregledom literature mogu se uočiti bitno različiti rezultati antibakterijskog i antifungalnog djelovanja eteričnog ulja čempresa. Inhibirajući učinak uglavnom je potvrđen na gram-pozitivnim bakterijama (Elansary i suradnici [65]) iako postoje radovi u kojima je zapaženo i djelovanje na gram-negativne bakterije istražene u ovom radu (Boukhris i suradnici [49], Mazari i suradnici. [51]). Antimikrobna aktivnost može se pripisati velikom udjelu komponenti  $\delta$ -karena,  $\alpha$ -pinena i  $\alpha$ -cedrola u uzorcima koji djeluju antibakterijski i antifungalno.



**Slika 43.** Utjecaj eteričnih ulja vrste piramidalni čempres, *Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis* (ZG) – lokacija Zagreb na bakterijske kulture *E. coli*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* te na kvasac *C. lipolytica*.

**Tablica 12.** Antimikrobna aktivnost uzoraka eteričnih ulja (polumjer u cm).

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida lipolytica</i>
Alepški bor, <i>Pinus halepensis</i> Miller, U1	0	2	0	0,25
Čempres, <i>Cupressus sempervirens</i> var. <i>horizontalis</i> , U2	0	1,5	0	0,75
Piramidalni čempres, <i>Cupressus sempervirens</i> L. var. <i>pyramidalis</i> , U3	0	0,5	0	0,5
Gluhač, <i>Juniperus phoenicea</i> , U4	0	0,75	0	0,75
Piramidalni čempres, <i>Cupressus sempervirens</i> L. var. <i>pyramidalis</i> , PČ	0	1	0	0
Alepški bor, <i>Pinus halepensis</i> Miller, Alepški bor	0	0,75	0	0,1
Piramidalni čempres, <i>Cupressus sempervirens</i> L. var. <i>pyramidalis</i> , ZG	0	1,25	0	0

Dobiveni rezultati za eterično ulje gluhača prikupljenog slažu se s literaturnim rezultatima inhibirajućeg učinka *B. subtilis* i izostanka inhibicije na *E. coli* Eryilmaza i suradnika [66], dok se razlikuju u rezultatima za inhibicijski učinak prema *P. aeruginosa*. Kao i u slučaju eteričnog ulja čempresa u literaturi se mogu pronaći bitno različiti rezultati. Tako su Mazari i suradnici [51] te Ennajer i suradnici [55] dokazali inhibirajući učinak na gram-pozitivne i gram negativne bakterije te neke gljivice. Antimikrobna aktivnost mogla bi se pripisati velikom udjelu komponenti  $\beta$ -felandrena,  $\alpha$ -pinena i Germakrena D u uzorcima koji djeluju antibakterijski i antifugalno.

U literaturnim rezultatima Eryilmaza i suradnika [66] ni jedna vrsta nema inhibirajući učinak na kvasac *C. lipolytica*.

Varijacije u kemijskom sastavu eteričnog ulja znatno utječu na antibakterijske aktivnosti. Može se zaključiti da područje, klimatski uvjeti, nadmorska visina, razdoblje prikupljanja biljka i metoda ekstrakcije eteričnog ulja znatno utječu na antimikrobnu aktivnost kao i djelovanju komponenta eteričnog ulja na mikroorganizme [27].



## 5. ZAKLJUČAK

Eterična ulja alepskog bora, horizontalnog i piramidalnog čempresa te gluhača ekstrahirana su hidrodestilacijom po Clavengeru te je provedena karakterizacija dobivenih uzoraka. Najveći prinos je dobiven hidrodestilacijom iglica piramidalnog čempresa (*Cupressus sempervirens L. var. pyramidalis*) s područja Zagreba. Glavne sastavnice u uzorcima eteričnih ulja su:  $\beta$ -kariofilen (54,64%),  $\alpha$ -humulen (11,18%) u alepskom boru (*Pinus halepensis* Miller);  $\alpha$ -pinen (H: 36,42%, V: 32,81-36,86%),  $\delta$ -karen (H: 25,53%, V: 17,94-18%),  $\alpha$ -cedrol (10,54%) u čempresu i piramidalnom čempresu te  $\alpha$ -pinen (49,08%),  $\beta$ -felandren (21,65%), Germakren D (27,01%) u gluhaču. Antimikrobnim testiranjem ustanovljeno je da uzorci eteričnih ulja ne pokazuju inhibirajući utjecaj na gram-negativne bakterije *E. coli* i *P. aeruginosa*, dok na gram-pozitivnoj bakteriji *B. subtilis* pokazuju inhibirajući učinak. Svi uzorci eteričnog ulja pokazali su inhibirajući utjecaj na kvasac *C. lipolytica*.

## Literatura

- [1] Kalodera, Zdenka, et al. "Eterična ulja (aetherolea)." *Farmaceutski glasnik* 54.6 (1998): str.195-210.
- [2] Preedy, Victor R. (ed.). *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Academic Press, 2015. str.1-10, str.31-38.
- [3] <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/essential-oil-market-119674487.html> (Pristup 26. srpnja 2021.)
- [4] <http://www.otok-brac.info/lokacije2/brac-opis.htm> (Pristup 26. srpnja 2021.)
- [5] Husnu Can Baser, K., et al. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*., 2015, Ed. 2. str. 1-127
- [6] Chávez-González, M. L., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N., *Essential Oils. Antibiotic Resistance*, 2016., str. 227–237.
- [7] Buckle, J. *Basic plant taxonomy, basic essential oil chemistry, extraction, biosynthesis, and analysis*. *Clinical aromatherapy*, 2015, str. 37-72.
- [8] Hazzoumi, Zakaria; MOUSTAKIME, Youssef; JOUTEI, Khalid Amrani. *Essential oil and glandular hairs: Diversity and roles*. In: *Essential oils-oils of nature*. IntechOpen, 2019., str. 83-84.
- [9] De Groot, Anton C.; Schmidt, Erich. *Essential oils, part III: chemical composition*. *Dermatitis*, 2016, 27.4: str. 161-169.
- [10] Loza-Tavera, Herminia. *Monoterpenes in essential oils*. *Chemicals via higher plant bioengineering*, 1999, str. 49-62.
- [11] Saldanha, Elroy, et al. *Health Effects of Various Dietary Agents and Phytochemicals (Therapy of Acute Pancreatitis)*. In: *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods*. Academic Press, 2018. p. 303-314.
- [12] Cannabis Aficionado, Delta 3 Carene: The Terpene That Promotes Healthy Bones (& Dry Mouth), <https://cannabisaficionado.com/delta-3-carene/> (Pristup 20. kolovoza 2021.)
- [13] MedChemExpress, Cedrol, <https://www.medchemexpress.com/cedrol.html> (Pristup 20. kolovoza 2021.)

- [14] Hartsel, Joshua A., et al. Cannabis sativa and Hemp. In: *Nutraceuticals*. Academic Press, 2016. str. 735-754.
- [15] Foreverest, Beta Phellandrene, <https://foreverest.cn/products/turpentine-derivatives/80-beta-phellandrene.html> (Pristup 20. kolovoza 2021.)
- [16] MedChemExpress, Germacrene D, <https://www.medchemexpress.com/germacrene-d.html> (Pristup 20. kolovoza 2021.)
- [17] Irshad, Muhammad, et al. Biological importance of essential oils. *Essential Oils-Oils of Nature*, 2020, 1., str. 37-40.
- [18]<https://www.zagrebacka-zupanija.hr/vijesti/5602/prirucnik-o-ekoloskoj-proizvodnji-i-uzgoju-ljekovi> (Pristup 5. kolovoz 2021.)
- [19]<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/mint-essential-oils-market> (Pristup 3. kolovoz 2021.)
- [20]<https://www.britannica.com/plant/Cupressaceae>(Pristup 3. kolovoz 2021.)
- [21] <https://www.plantea.com.hr/cempres/> (Pristup 3. kolovoz 2021.)
- [22] Orhan, Ilkay Erdogan; Tumen, Ibrahim. Potential of *Cupressus sempervirens* (Mediterranean cypress) in health. In: *The Mediterranean diet*. Academic Press, 2015. str. 639-647.
- [23]<https://janaf.hr/zastita-okolisa/eko-kutak/mediteranski-cempres-prirodna-brana-pozarima> (Pristup 3. kolovoz 2021.)
- [24] <https://www.plantea.com.hr/gluhac/> (Pristup 3. kolovoz 2021.)
- [25] Nedjimi, Bouzid; Beladel, Brahim; Guit, Brahim. Multi-element determination in medicinal Juniper tree (*Juniperus phoenicea*) by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 2015, 8.2: str. 243-246.
- [26] <https://www.plantea.com.hr/alepski-bor/> (Pristup 3. kolovoz 2021.)
- [27] Fekih, Nadia, et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian pacific journal of tropical disease*, 2014, 4.2: str. 97-103.

- [28] Zeiner, Michaela; Kuhar, Ana; Juranović Cindrić, Iva. Geographic differences in element accumulation in needles of Aleppo Pines (*Pinus halepensis* Mill.) grown in Mediterranean region. *Molecules*, 2019, 24.10: 1877.
- [29] El Asbahani, A., et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 2015, 483.1-2: str. 220-243
- [30] <http://www.koval.hr/blogeky/ulja/destilacija/pages.html> (Pristup 13. kolovoza 2021.)
- [31] Tongnuanchan, Phakawat; Benjakul, Soottawat. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 2014, 79.7: str. 1231-1249.
- [32] <https://microchemlab.com/microorganisms/bacillus-subtilis> (Pristup 20. kolovoza 2021.)
- [33] <https://www.sanzymebiologics.com/blog/bacillus-subtilis-application/>(Pristup 9. rujna 2021.)
- [34]<http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-prirucnik/infektologija/gram-negativni-bacili/pseudomonasne-i-srodne-infekcije>(Pristup 20. kolovoza 2021.)
- [35]<https://wickhamlabs.co.uk/technical-resource-centre/fact-sheet-pseudomonas-aeruginosa/> (Pristup 20. kolovoza 2021.)
- [36]<https://www.biomerieux-industry.com/pharma-healthcare/resources/pharma-microorganisms-library/2020-03-02-how-does-pseudomonas>(Pristup 9. rujna 2021.)
- [37]<https://www.krenizdravo.hr/zdravlje/bolesti-zdravlje/escherichia-coli-uzroci-simptomi-i-lijecenje> (Pristup 20. kolovoza 2021.)
- [38]<https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26315/Escherichia-coli.html%20>(Pristup 9. rujna 2021.)
- [39] Elansary, Hosam O., et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaves essential oils from *Syzygium cumini* L., *Cupressus sempervirens* L. and *Lantana camara* L. from Egypt. *Journal of Agricultural science*, 2012, 4.10: 144.
- [40] <https://www.nutraingredients.com/Article/2019/02/22/EFSA-report-no-safety-concerns-in-supplemental-use-of-Yarrowia-lipolytica-yeast>(Pristup 9. rujna 2021.)

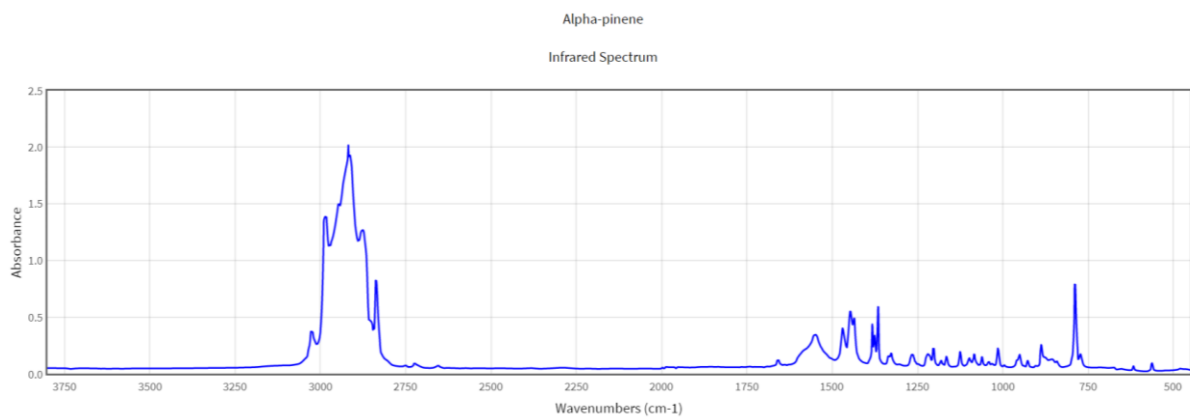
- [41] Asgary, Sedigheh, et al. Chemical analysis and biological activities of *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* essential oils. *Pharmaceutical biology*, 2013, 51.2: 137-144.
- [42] Derwich, E., et al. Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *Int J Agric Biol*, 2010, 12.2: 199-204.
- [43] Amri, Ismail, et al. Chemical composition, physico-chemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils. *Biological agriculture & horticulture*, 2013, 29.2: 91-106.
- [44] Hamrouni, Lamia, et al. Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities. *Archives of phytopathology and plant protection*, 2015, 48.2: 145-158.
- [45] Dob, T.; Berramdane, T.; Chelgoum, C. Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *CR Chimie*, 8: 1939-1945. *the text*, 2005.
- [46] Elkady, Wafaa M., et al. Impact of Altitudinal Variation on the Phytochemical Profile, Anthelmintic and Antimicrobial Activity of Two *Pinus* Species. *Molecules*, 2021, 26.11: 3170.
- [47] Ucar, Güneş; Ucar, Mualla Balaban; Fakir, Hüseyin. Composition of volatile foliage isolates from *Cupressus sempervirens* varieties (Var. *horizontalis* Mill. and *pyramidalis* Nyman) growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 2007, 19.6: 562-565.
- [48] Hassanzadeh Khayyat, Mohammad, et al. Chemical and antimicrobial studies of *Cupressus sempervirens* L. and *C. horizontalis* Mill. essential oils. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 2.2: 103-108.
- [49] Boukhris, Maher, et al. Chemical composition and biological potential of essential oil from Tunisian *Cupressus sempervirens* L. *Journal of arid land studies*, 2012, 22.1: 329-332.
- [50] Adams, Robert P.; Mataraci, Tuğrul; BARTEL, Jim A. Comparison the leaf essential oils of the cultivated fastigiate (strict) growth forms of *Cupressus sempervirens* in California and Turkey.
- [51] Mazari, Khadidja, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, 4.10: 959-964.

- [52] Achak, Nadia, et al. Essential oil composition of *Juniperus phoenicea* from Morocco and Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2008, 11.2: 137-142.
- [53] Ait-Ouazzou, Abdenour, et al. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 2012, 45.1: 313-319.
- [54] Ramdani, Messaoud, et al. Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2013, 3.11: 22.
- [55] Ennajar, M., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Abderraba, M., Raies, A., & Romdhane, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L.(Cupressaceae). *Journal of food science*, 74(7)
- [56] Rezzi, Serge, et al. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, 29.2: 179-188.
- [57] El Hajjouji, H., Rahhal, R., Gmouh, S., Hsaine, M., Fougrach, H., & Badri, W. (2019). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Juniperus phoenicea*, *Juniperus thurifera* and *Juniperus oxycedrus*. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 9(3), 190-198.
- [58] <https://webbook.nist.gov/> (Pristup 20. kolovoz 2021.)
- [59] <https://spectrabase.com/> (Pristup 20. kolovoz 2021.)
- [60] Dragar, Valerie Annette. *Olearia Phlogopappa: aspects of clonal cultivation and essential oil characterisation*. 1991. PhD Thesis. University of Tasmania.
- [61] Kendall, David; Alexander, Stephen. *Cannabinoid pharmacology*. Academic Press, 2017.
- [62] Taraj, Krenaida, et al. Spectroscopic study on chemical composition of essential oil and crude extract from Albanian *Pinus halepensis* Mill. *Journal of Agriculture Informatics*, 2018, 9.1: str. 41-46.

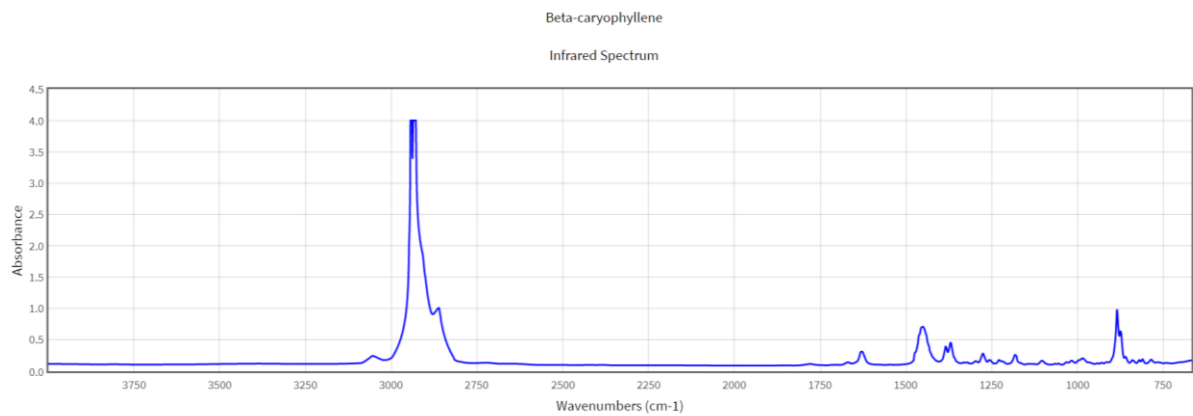
- [63] Abi-Ayad, M., et al. Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *J Nat Prod Plant Resour*, 2011, 1.1: 33-36.
- [64] Bouyahya, Abdelhakim, et al. Chemical composition of *Mentha suaveolens* and *Pinus halepensis* essential oils and their antibacterial and antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2019, 12.3: 117.
- [65] Liu, Wen-Cheng, et al. *Candida lipolytica* candidemia as a rare infectious complication of acute pancreatitis: a case report and literature review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2013, 46.5: str. 393-396.
- [66] Eryilmaz, Müjde; Tosun, Alev; Tumen, İbrahim. Antimicrobial activity of some species from Pinaceae and Cupressaceae. *Turk J Pharm Sci*, 2016, 13.1: 35-40.

## PRILOZI

### FTIR spektri najzastupljenijih sastavnica eteričnih ulja

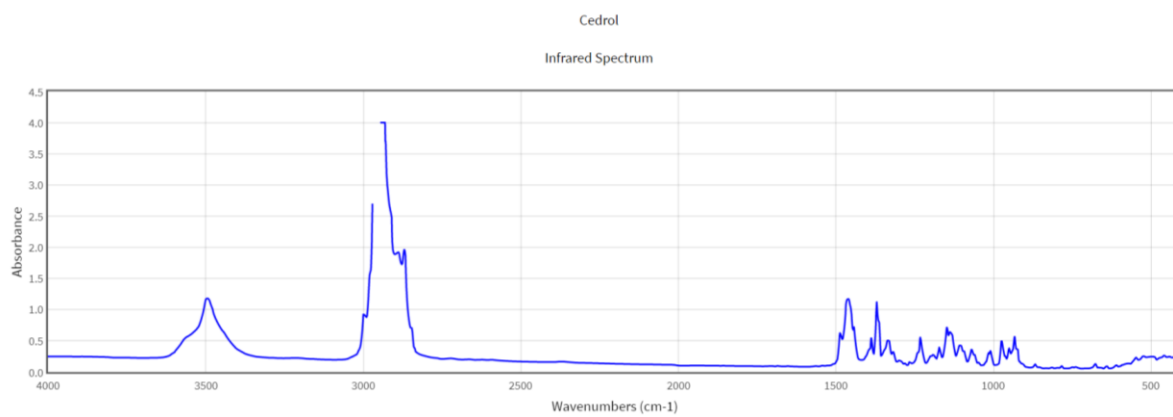


**Slika 27.** FTIR spektar sastavnice eteričnog ulja  $\alpha$ -pinena [58].

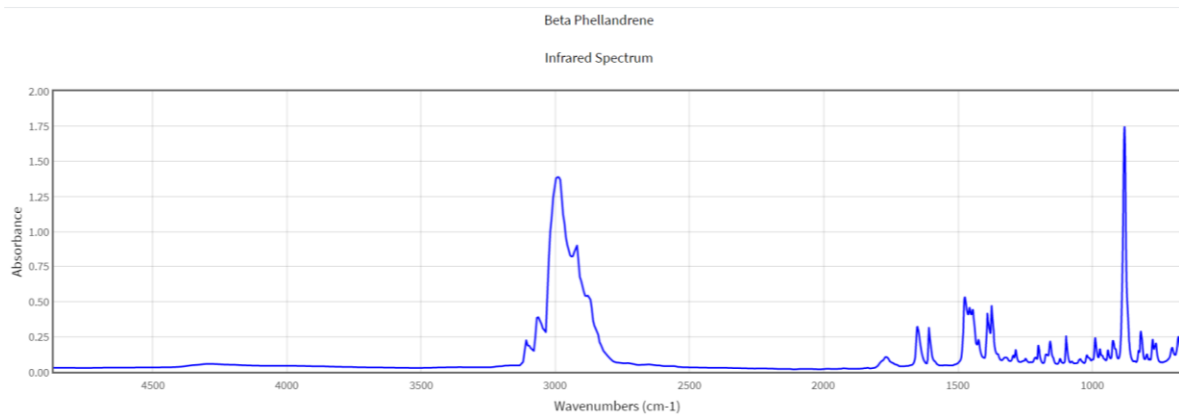


**Slika 28.** FTIR spektar sastavnice eteričnog ulja  $\beta$ -kariofilena [58].

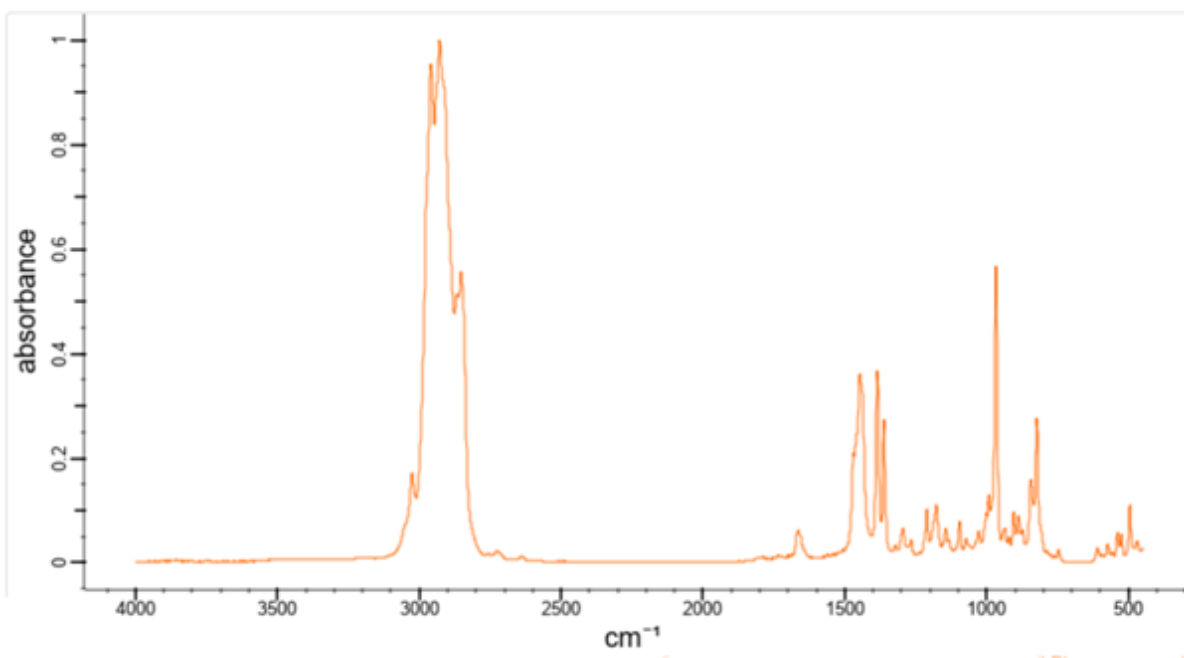




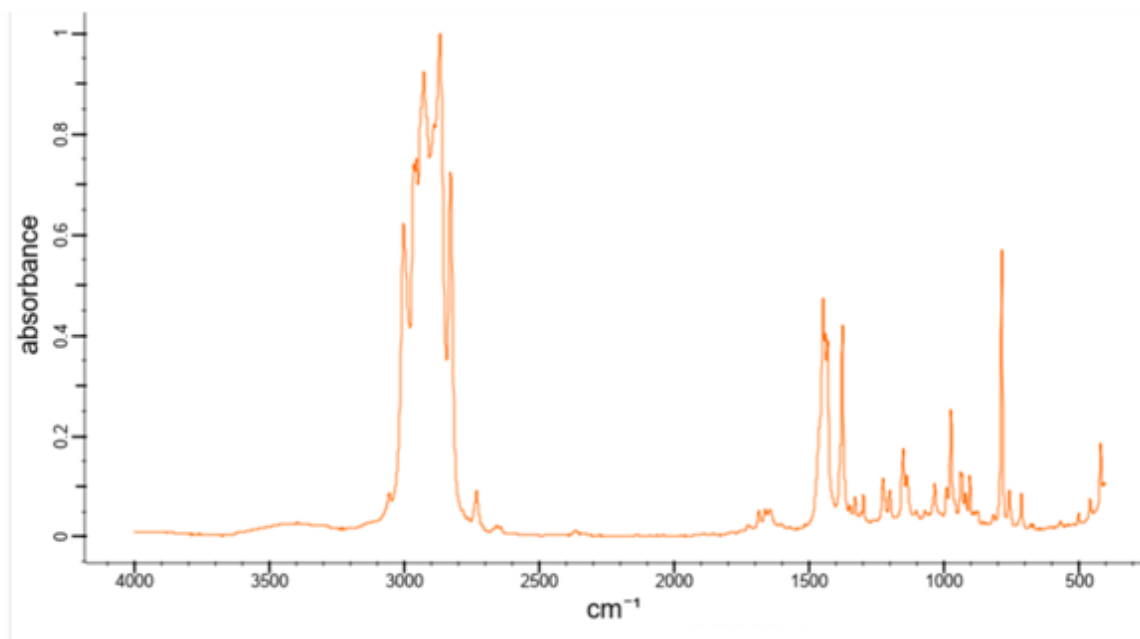
**Slika 29.** FTIR spektar sastavnice eteričnog ulja  $\alpha$ -cedrola [58].



**Slika 30.** FTIR spektar sastavnice eteričnog ulja  $\beta$ -felandrena [58].

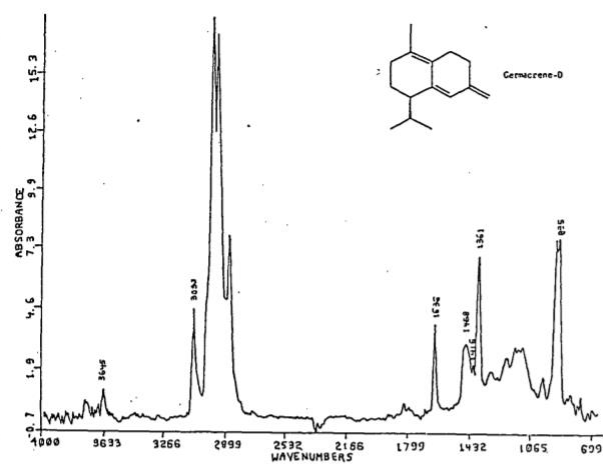


**Slika 31.** FTIR spektar sastavnice eteričnog ulja  $\alpha$ -humulena [59].



**Slika 32.** FTIR spektar sastavnice eteričnog ulja  $\delta$ -karena [59].

FIGURE IV.2.14  
FTIR SPECTRUM OF GERMACRENE-D



Slika 33. FTIR spektar sastavnice eteričnog ulja germakrena D [60].