

Karakterizacija ekstrakata đumbira i kurkume

Blažević, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:149:556025>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-07**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Iva Blažević

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Iva Blažević

Predala je izrađen diplomski rad dana: 20. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, Farmaceutsko-biokemijski
fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 25. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Iva Blažević

KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA ĐUMBIRA I KURKUME

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Aleksandra Sander
izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
doc. dr. sc. Maja Bival Štefan

Zagreb, rujan 2023.

Iz srca se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Aleksandri Sander, i asistentici dr.sc. Ani Petračić, koje su svojom nesebičnom podrškom, stručnim vodstvom te neumornim zalaganjem omogućile izradu ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se doc. dr. sc. Maji Bival Štefan i izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić za njihov dragocjeni doprinos u eksperimentalnom dijelu rada.

Isto tako, zahvaljujem se svim kolegama sa Zavoda za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo koji su mi pružili pomoć kad god je bilo potrebno.

Na kraju, zahvaljujem se obitelji i prijateljima za svu podršku, pomoć i beskrajno strpljenje tijekom ovog akademskog pothvata.

SAŽETAK RADA

Iako su eterična ulja sastavni dio ljudske povijesti i kulture već dugi niz stoljeća, njihova raznolika svojstva i danas omogućavaju razvoj inovativnih proizvoda u raznim industrijskim granama, posebice u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Budući da u današnje vrijeme fokus na ekološki održive proizvode dobiva na zamahu, uloga eteričnih ulja time postaje još značajnija.

Cilj ovog rada bio je provođenje kvantitativne i kvalitativne analize ekstrakata dobivenih iz rizoma biljaka *Zingiber officinale* i *Curcuma longa* te ispitivanje antimikrobne aktivnosti na bakterijama *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, i kvascu *Candida lipolytica*. Provedena je karakterizacija pomoću tankoslojne kromatografije, plinske kromatografije s masenom spektrometrijom, infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom i UV/Vis spektrofotometrije. Navedenim metodama utvrđena je varijabilnost kemijskog sastava ovisno o metodi ekstrakcije, načinu sušenja i ekstrakcijskom otapalu.

Disk difuzijskim testom ispitivana je antimikrobna aktivnost ekstrakata đumbira i kurkume. Utvrđeno je značajno inhibicijsko djelovanje ekstrakata kurkume na testirane mikroorganizme, dok su ekstrakti dobiveni iz đumbira demonstrirali značajno inhibicijsko djelovanje na bakteriju *B. subtilis* i kvasac *C. lipolytica*.

Ključne riječi: *Curcuma longa*, ekstrakcija, eterično ulje, hidrodestilacija, *Zingiber officinale*

ABSTRACT

While essential oils have been an integral part of human history and culture for centuries, their diverse properties continue to facilitate the development of innovative products across various industrial sectors, particularly in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries. As the focus on ecologically sustainable products gains momentum, the role of essential oils becomes even more significant.

The aim of this study was to conduct a quantitative and qualitative analysis of extracts obtained from the rhizomes of *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* plants, as well as to investigate their antimicrobial activity against the bacteria *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and the yeast *Candida lipolytica*. Characterization was carried out using thin-layer chromatography, gas chromatography-mass spectrometry, Fourier-transform infrared spectroscopy, and UV/Vis spectrophotometry. Through these methods, the variability in chemical composition was determined, dependent on extraction method, drying technique, and solvent used for extraction.

The antimicrobial activity of ginger and turmeric extracts was assessed using disk diffusion tests. A significant inhibitory effect of turmeric extracts on the tested microorganisms was observed, while extracts derived from ginger demonstrated substantial inhibitory activity against the bacterium *B. subtilis* and the yeast *C. lipolytica*.

Keywords: *Curcuma longa*, essential oil, extraction, hydrodistillation, *Zingiber officinale*

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. ETERIČNA ULJA	2
1.1.1. Povijest razvoja eteričnih ulja.....	2
1.1.2. Kemijski sastav eteričnih ulja.....	2
1.2. AROMATIČNE BILJKE PORODICE <i>ZINGIBERACEAE</i>	3
1.2.1. Đumbir.....	3
1.2.1.1. Bioaktivne komponente đumbira.....	4
1.2.1.2. Ljekovita svojstva đumbira.....	5
1.2.2. Kurkuma	7
1.2.2.1. Bioaktivne komponente kurkume.....	8
1.2.2.2. Ljekovita svojstva kurkume.....	9
1.3. METODE EKSTRAKCIJE ETERIČNIH ULJA	11
1.3.1. Hidrodestilacija.....	12
1.3.2. Odošenje vodenom parom	13
1.3.3. Ekstrakcija organskim otapalom.....	13
1.3.4. Soxhlet ekstrakcija.....	14
1.3.5. Hladno prešanje	15
1.3.6. Ekstrakcija superkritičnim fluidima	15
1.3.7. Ekstrakcija subkritičnim fluidima.....	16
1.3.8. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	17
1.3.9. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	18
1.3.10. Trenutni kontrolirani pad tlaka	18
1.4. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA	19
1.4.1. <i>Escherichia coli</i>	19
1.4.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	20
1.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.4.4. <i>Bacillus subtilis</i>	21
1.4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.4.6. <i>Candida lipolytica</i>	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO	23
2.1. PLAN I PROVEDBA EKSPERIMENTA	23
2.2. KEMIKALIJE.....	23
2.3. INSTRUMENTI	24
2.4. PRIPREMA UZORAKA	24
2.5. HIDRODESTILACIJA.....	24

2.6.	SOXHLET EKSTRAKCIJA	26
2.7.	MACERACIJA	27
2.8.	EKSTRAKCIJA UZ MAGNETSKO MIJEŠANJE	27
2.9.	EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM.....	28
2.10.	ANALITIČKE METODE.....	29
2.10.1.	Tankoslojna kromatografija (TLC).....	29
2.10.2.	Plinska kromatografija s masenom spektroskopijom (GC-MS).....	29
2.10.3.	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)	30
2.10.4.	UV/Vis spektrofotometrija.....	31
2.11.	ANTIMIKROBNA AKTIVNOST.....	31
3.	REZULTATI I RASPRAVA	33
3.1.	HIDRODESTILACIJA.....	33
3.1.1.	Prinos eteričnog ulja	33
3.1.1.1.	<i>Zingiber officinale</i>	34
3.1.1.2.	<i>Curcuma longa</i>	36
3.2.	KEMIJSKI SASTAV	37
3.2.1.	Tankoslojna kromatografija (TLC).....	37
3.2.1.1.	<i>Zingiber officinale</i>	37
3.2.1.2.	<i>Curcuma longa</i>	39
3.2.2.	Plinska kromatografija s masenom spektroskopijom (GC/MS)	40
3.2.2.1.	<i>Zingiber officinale</i>	40
3.2.2.2.	<i>Curcuma longa</i>	42
3.2.3.	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)	45
3.2.3.1.	<i>Zingiber officinale</i>	45
3.2.3.2.	<i>Curcuma longa</i>	46
3.2.4.	UV/Vis spektrofotometrija.....	47
3.2.4.1.	<i>Zingiber officinale</i>	48
3.2.4.2.	<i>Curcuma longa</i>	51
3.3.	ANTIMIKROBNA AKTIVNOST.....	53
3.3.1.	<i>Zingiber officinale</i>	54
3.3.2.	<i>Curcuma longa</i>	55
4.	ZAKLJUČAK.....	57
	LITERATURA.....	58
	PRILOZI	67

UVOD

Kroz čitavu povijest ljudske civilizacije, biljke i njezini ekstrakti imale su veliki značaj u ublažavanju tegoba i liječenju bolesti. [1] Eterična ili esencijalna ulja, sekundarni metaboliti biljaka izolirani iz cvjetova, plodova, pupova, korijena, lišća, grančica i sjemenki, vrlo su često korištena u razne svrhe. [2] Riječ je o koncentriranim hidrofobnim kapljevinama koje karakterizira aromatičnost, ali i raznolika ljekovita svojstva. [3]

Zapisi o biljnim ekstraktima dobivenih destilacijom datiraju unazad 4500 pr.Kr. kada su u mnogim kulturama korišteni u kozmetičke svrhe. Tijekom 18. i 19. stoljeća, zabilježena je prisutnost niza bioaktivnih spojeva, poput morfija, kofeina i kinina, kojima su pripisana snažna terapijska svojstva. Time je započeta epoha intenzivnog istraživanja sastava i svojstava ekstrakata iz raznovrsnih biljaka. No unatoč tisućljetnoj upotrebi ayurvedskih biljaka u tradicionalnoj medicini, prvenstveno đumbira i kurkume, tek sredinom 20. stoljeća započeto je istraživanje njihovih sastava i ljekovitih svojstava. [4]

Ekstrakti mogu sadržavati stotine različitih spojeva, a svaki ima jedinstven profil koji određuje njegovu aromu i potencijalne biološke učinke. Stoga, istraživanje ekstrakata đumbira i kurkume područje je velikog interesa u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i poljoprivrednoj industriji. Dodatni interes za njihovim istraživanjem potaknuo je razvoj principa “zelene kemije”, ali i sve veća rezistentnost bakterija na konvencionalne lijekove. Svi ovi faktori potaknuli su rastući interes za prirodne alternativne lijekove zamjenjujući time konvencionalne medicinske pristupe i lijekove. Istovremeno, procjenjuje se da industrija mirisa i aromaima globalnu vrijednost od 15 milijardi dolara, a sve veći interes kupaca za prirodnim proizvodima doveo je do intenzivnije upotrebe eteričnih ulja i u ovoj industriji. [5]

Ekstrakcija je ključni postupak za izolaciju i koncentriranje određenih sastojaka iz biljnog materijala korištenjem selektivnih otapala i primjenom standardnih procedura. [1] U sklopu ovog rada, provedena je ekstrakcija eteričnih ulja iz đumbira (lat. *Zingiber officinale*) i kurkume (lat. *Curcuma longa*) kupljenih u maloprodajnoj trgovini, porijeklom iz Perua. Cilj je bio istražiti učinak provedbe raznih metoda ekstrakcije na kvalitetu dobivenih ekstrakata te provesti ispitivanje antimikrobnih svojstava dobivenih ekstrakata.

1. OPĆI DIO

1.1. ETERIČNA ULJA

1.1.1. Povijest razvoja eteričnih ulja

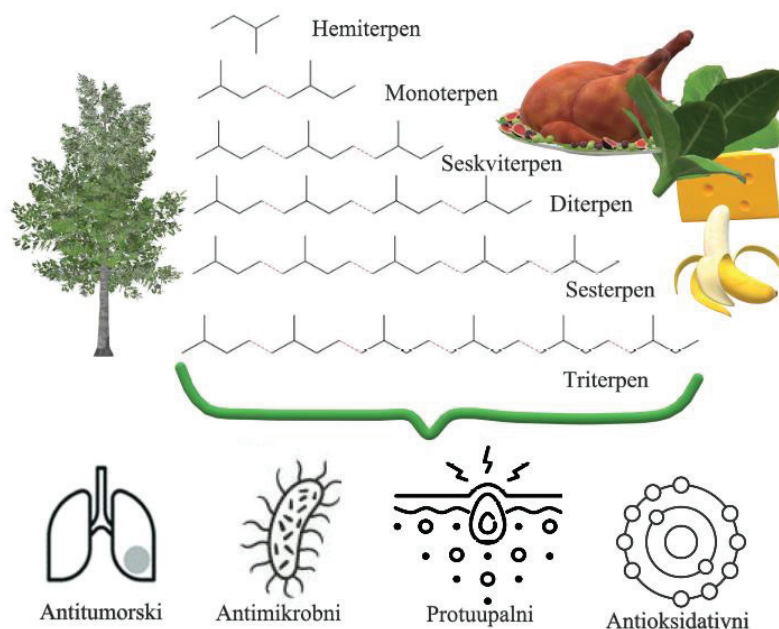
Eterična ili esencijalna ulja predstavljaju koncentriranu kompleksnu mješavinu hlapljivih organskih spojeva koji se dobivaju iz biljnog materijala. Pohranjuju se u sekretornim stanicama, šupljinama, kanalima, epidermalnim stanicama i žljezdanim trihomama biljaka, iz kojih se potom ekstrahiraju.[3]

Prva zabilježena upotreba eteričnih ulja je bila od strane drevnih Egipćana koji su ih primjenjivali u različite svrhe, uključujući medicinske, kozmetičke, ali i u vjerskim obredima. Istovremeno, Kinezi su koristili biljke i njihove ekstrakte u medicinske svrhe, a njihovi su postupci s vremenom asimilirani u indijsku ayurvedsku medicinu. Pojam „aromaterapija“ uveo je u rječnik francuski kemičar Gattefosse nakon incidenta u laboratoriju. Zadobivenu opekotinu je tretirao čistim uljem lavande, koje je ublažilo bol, a opekлина je kasnije zacijelila bez infekcije i s malim ili nikakvim ožiljcima. Ova tehnika kasnije je s velikim uspjehom korištena u liječenju vojnika ranjenih u Prvom svjetskom ratu. U današnje vrijeme, eterična ulja se naširoko koriste kao parfemi i arome za hranu, no mnoga njihova baktericidna i antipesticidna svojstva zamijenjena su antibioticima, sintetičkim pesticidima i antifungalnim sredstvima. [6]

1.1.2. Kemijski sastav eteričnih ulja

Bioaktivni spojevi koji se nalaze u eteričnom ulju posjeduju širok raspon bioloških svojstava uključujući antikancerogeno, antimikrobno, protuupalno, antioksidativno i antialergijsko djelovanje. Najvažnija skupina sastojaka eteričnih ulja su terpeni, terpenoidi, seskviterpeni, seskviterpenoidi i fenoli. Terpeni su velika i raznolika klasa organskih spojeva sastavljena isključivo od ugljika i vodika, dok se terpenoidi definiraju kao modificirana klasa terpena s različitim funkcionalnim skupinama, najčešće oksigeniranim skupinama i mogu imati složenije cikličke strukture. [7] Terpeni su osnovna strukturna komponenta eteričnih ulja koja čine više od 50 % ukupnog eteričnog ulja ovisno o načinu ekstrakcije i korištenim biljnim dijelovima. Dijele se na temelju broja n u općoj formuli $(C_5H_8)_n$ ili broja C atoma na: hemiterpene (C_5), monoterpene (C_{10}), seskviterpene (C_{15}), diterpene (C_{20}), sesterpeni (C_{25}), triterpene (C_{30}), tetraterpene (C_{40}), politerpene ($>C_{40}$). Seskviterpeni su podklasa terpena koja se sastoji od tri izoprenske jedinice s 15 ugljikovih atoma, a seskviterpenoidi predstavljaju

oksidirane seskviterpene. Međutim, uz prisutnost fenola i alkohola, eterična ulja sadrže i druge spojeve poput aldehida, estera, etera, ketona, laktona, kumarina i raznih oksida. [5]



Slika 1. Potencijalni biološki učinci terpena i terpenoida u eteričnim uljima

1.2. AROMATIČNE BILJKE PORODICE *ZINGIBERACEAE*

Porodica đumbirovki (lat. *Zingiberaceae*), poznata je po različitim bioaktivnim kemijskim spojevima. Čine ju 52 roda i 1300 vrsta aromatičnih cvjetnih višegodišnjih biljaka s karakterističnim gomoljastim rizomima. Široko su rasprostranjene u Americi, Aziji i Africi, a najznačajniji članovi ove porodice su đumbir (lat. *Zingiber officinale Roscoe*), kurkuma (lat. *Curcuma longa L.*), javanski đumbir (lat. *Curcuma zanthorrhiza Roxb.*) i tajlandski đumbir (lat. *Alpinia galanga L.*). [8]

1.2.1. Đumbir

Đumbir (lat. *Zingiber officinale*) je trajnica odnosno višegodišnja biljka iz porodice *Zingiberaceae* koja potječe iz tropskih područja Azije. Porijeklo imena đumbir može se pratiti do sanskrske riječi "*srngaveram*", što znači "*rog*" ili "*jelenov rog*" zbog sličnosti sa jelenovim rogovima što se primjećuje na slici 2.



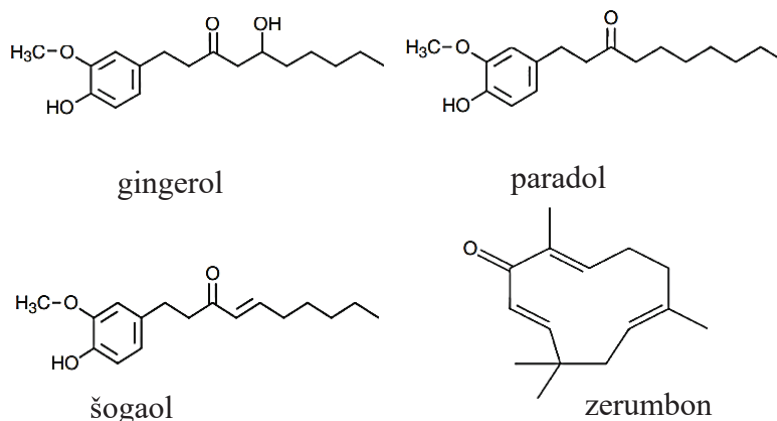
Slika 2. Rizom đumbira [9]

Karakterizira ga aromatični rizom koji se koristi u svježem ili sušenom obliku te se svrstava među najraširenije začine u svijetu, ali koristi se i kao lijek u narodnoj medicini zbog brojnih ljekovitih svojstava. [10]

Njegova upotreba je zabilježena u zapisima drevne iranske medicine, a pojedina svojstva pripisana đumbiru već tada, potvrđena su suvremenim znanstvenim istraživanjima. [10,11,12] Također, korijen đumbira koristi se u Kini za liječenje glavobolje, mučnine i prehlade više od 2500 godina, dok se u Zapadnom svijetu, koristi prvenstveno kao lijek za probavu.[13,14] Istraživanja provedena na demografskom uzorku stanovništva jugoistočne Azije ukazuju na znatno niži rizik od razvoja gastrointestinalnih karcinoma, karcinoma debelog crijeva, dojke, prostate i drugih oblika u usporedbi s zapadnim državama. Ova razlika u riziku može se djelomično pripisati većoj konzumaciji određene hrane, kao što su soja, čaj, češnjak, kurkuma i đumbir, među stanovništvom Jugoistočne Azije. [15]

1.2.1.1. Bioaktivne komponente đumbira

Postoji više od 200 identificiranih spojeva u đumbiru, a njegovi bioaktivni sastojci uključuju tanine, antocijanine, terpeno i fenolne spojeve. Svi identificirani spojevi se dijele u dvije skupine: eterično ulje i opori spojevi/aril alkani (engl. *pungent compounds*). Komponente eteričnih ulja čine približno 1-3% biljke i sastoje se od seskviterpenskih spojeva, pretežno zingiberena, kurkumena, farnezena i zerumbona. U skupinu oporih spojeva/aril alkana svrstavaju se gingeroli, šogaoli i paradoli, prikazani na slici 2.



Slika 3. Shematski prikaz kemijskih struktura gingerola, paradola, šogaola i zerumbona

Fenolni spojevi u đumbiru uključuju gingerole, šogaole i paradole. U svježem đumbiru, gingeroli su glavni polifenoli te se tu ubrajaju 6-gingerol, 8-gingerol i 10-gingerol. S toplinskom obradom ili tijekom dugotrajnog skladištenja, gingerol se transformira u šogaol. Nakon hidrogenacije, šogaol prelazi u paradol. [15] Među ostalim prisutnim komponentama eteričnog ulja nalaze se i β -bisabolen, α -farnesen, cineol, zingiberenol, limonen te druge tvari. [16] Osim njih, u đumbiru su prisutni i polisaharidi, lipidi, organske kiseline i sirova vlakna.

1.2.1.2. Ljekovita svojstva đumbira

Đumbir se prvenstveno upotrebljava u svježem obliku ili kao samljeveni prah, prethodno osušenog korijena, koji se potom koristi u proizvodnji eteričnog ulja. Čimbenici koji utječu na kvalitetu đumbira pod velikim su utjecajem okoliša u kojem se đumbir uzgaja. [16] Primjerice, đumbir uzgojen u Kini sadrži 43 različita spoja u usporedbi sa istom vrstom đumbira uzgojenog u Indiji koji je posjedovao ukupno 80 spojeva s različitim udjelima tvari. [17,18] S obzirom da je vidljiv utjecaj lokacije i trajanja uzgoja na kemijski sastav eteričnog ulja đumbira, pretpostavka je da način uzgoja mijenja i biološku aktivnost eteričnog ulja.

Đumbiru se pripisuje analgetičko, antimikrobno, antitumorsko, protuupalno i antioksidativno djelovanje. Štoviše, istraživanja i upotreba đumbira su posljednjih godina usmjerena u njegovu ulogu u borbi protiv raka radi antitumorskog djelovanja, smanjenja nuspojava izazvanih kemoterapijom, ali i općenitog poboljšanja kvalitete ljudskog života. [19] Značajan porast istraživanja vezanih za potencijalne zdravstvene koristi đumbira potvrđuju učinkovitost đumbira u očuvanju ljudskog zdravlja.

Budući da je upotreba alternativne medicine istaknuta među populacijom koja pati od kroničnih bolova, provedeno je istraživanje kako bi se dokazao učinak ekstrakta đumbira na navedene tegobe. Pritom je dokazana djelotvornost đumbira u liječenju tegoba osteoartritisa. Statistički značajno smanjenje simptoma osteoartritisa u koljenima kod pacijenata postignuto je primjenom visoko pročišćenog i standardiziranog ekstrakta đumbira. [20]

Različita “*in vitro*” istraživanja također potvrđuju antimikrobno svojstvo ekstrakta đumbira. Naime, fenolni spojevi i njihov sinergistički odnos s drugim prisutnim spojevima (β -seskvifelandren, cis-kariofilen, zingiberen, α -farnezen, α - i β -bisabolen) odgovorni su za antimikrobno djelovanje ekstrakta đumbira. S obzirom da je većina navedenih spojeva netopljiva u vodi, vodeni ekstrakti u pravilu postižu nižu antimikrobnu aktivnost od organskih ekstrakata. [21] Glavni spojevi s antimikrobnim djelovanjem prisutni u eteričnom ulju od svježeg đumbira su geranijal, α -zingiberen, (E,E)- α -farnezen, neral, ar-kurkumen, i β -seskvifelandren, dok su u uljnim smolama za taj efekt odgovorni eugenol, zingeron i trans-6-gingerol. [22] El-Baroty i sur. su proveli istraživanje kojim je dokazano da se antimikrobno djelovanje hlapljivih komponenti đumbira u eteričnom ulju smanjuje prema sljedećem redoslijedu: fenolni spojevi > alkoholi > aldehidi > ketoni > eteri > ugljikovodici. [23]

Naime, hidrofobni spojevi prisutni u eteričnom ulju đumbira mogu reagirati s lipofilnim dijelom staničnih membrana i mitohondrijima, što dovodi do narušavanja njihove cjelovitosti i funkcije. To može rezultirati poremećajem transporta elektrona, unosa hranjivih tvari, sinteze proteina i nukleinskih kiselina te aktivnosti enzima [24]. Oksigenirani spojevi također mogu inhibirati stanično disanje i transport iona. Stoga, ovi spojevi na različite načine utječu na mikrobne stanice.

Rak ili karcinom drugi je najveći uzrok smrti u svijetu usprkos velikom razvoju kemoterapeutika i raznovrsnih metoda liječenja. S obzirom na često ozbiljnu toksičnost i nuspojave uzrokovane nedovoljnom selektivnošću i specifičnošću trenutno dostupnih mogućnosti liječenja, znanstvenici su u potrazi za novim lijekovima. Dokazano je da zerumbon inhibira rast i proliferaciju tumorskih stanica gušterače različitim mehanizmima. Zerumbon inducira apoptozu PANC-1 stanica, a indukcija apoptoze povezana je s regulacijom p53 i p21 proteina kao i proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) u PANC-1 stanice tretirane zerumbonom. [25] Druga studija je pokazala da 6-gingerol regulira proteine i suzbija metastaziranje stanica raka gušterače. „*In vitro*“ istraživanjem dokazana je indukcija apoptoze stanica raka želuca sa 6-gingerolom. [26]

Upala je odgovor tijela na oštećenje tkiva pri čemu se oslobađaju proupalni medijatori. Nekoliko stvari može uzrokovati upalu poput bakterija, virusa, gljivica, parazita, a također može biti posljedica prisutnosti stranih proteina i oštećenja. Gingeroli mogu ublažiti upalu s obzirom na njihovu sposobnost da inhibiraju aktivaciju signalnih putova protein kinaze B (Akt) i nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B), uzrokujući smanjenje proinflamatornih povećanje protuinflamatornih citokina. Međutim, problem predstavlja njihova niska bioraspoloživost, stoga je potrebno je razviti učinkovitije metode liječenja gingerolima. [27]

Povećana proizvodnja slobodnih radikala rezultira oksidativnim stresom koji može dovesti do oštećenja DNK. Đumbir posjeduje snažna antioksidativna svojstva koja ublažavaju ili sprječavaju nastanak slobodnih radikala te se smatra sigurnim biljnim lijekom s vrlo malo nuspojava. [28] 6-šogaol je pokazao najjača antioksidativna i protuupalna svojstva u đumbiru, što se može pripisati prisutnosti α , β -nezasićenog ketonskog dijela. [29]

1.2.2. Kurkuma

Kurkuma (lat. *Curcuma longa*) je član porodice biljaka *Zingiberaceae* kao i đumbir te je porijeklom iz Južne Azije gdje se upotrebljava već tisućama godina. Riječ je o višegodišnjoj biljci koja sazrijeva 9 mjeseci te može narasti do 1,5 m visine iz gomoljastog rizoma prikazanog na slici 4., koji naveliko služi kao začim jelima, bojilo, ali i potencijalni lijek radi raznolikih ljekovitih svojstava.[30]



Slika 4. Rizom kurkume [31]

Ima najmanje 6000 godina dokumentirane upotrebe kao „zlatnog začina“, a od nedavno pronalazi široku primjenu u industriji mirisa i aroma, kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Kurkuma se može koristiti u svježem obliku ili u obliku eteričnog

ulja, no većina proizvoda se dobiva sušenjem korijena biljke, koji se potom melje u fini prah žute boje. Sadrži više od 200 različitih spojeva, a najvažniji je kurkumin iz skupine kurkuminoida. [32]

1.2.2.1. Bioaktivne komponente kurkume

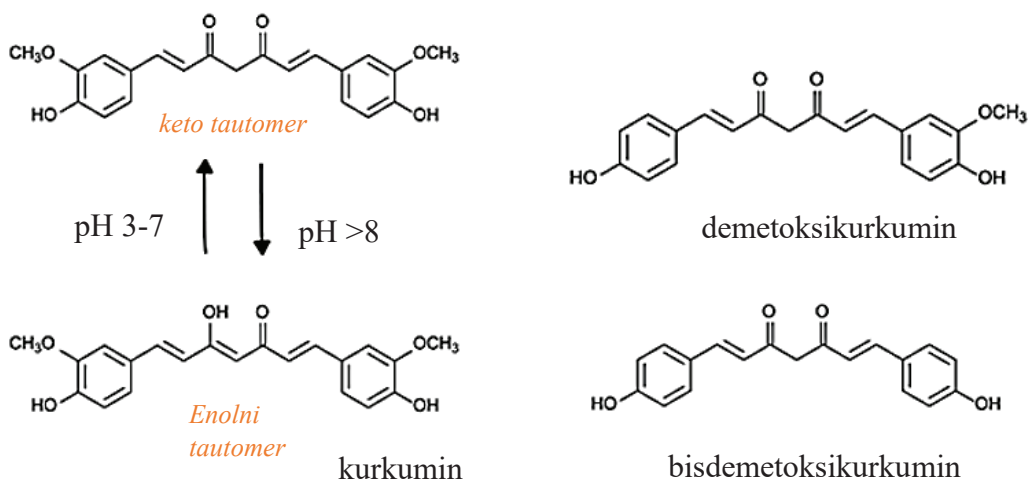
Kurkuma je poznata po raznolikošću kemijskih spojeva, pri čemu je dosad identificirano 235 spojeva koji uključuju monoterpenoide, seskviterpenoide, diterpenoide, triterpenoide, kurkuminoide i konjugirane kurkuminoide, fenolne spojeve, flavonoide, saharide, steroide, masne kiseline i alkaloida. [31,32]

Iako glavninu kurkume čine ugljikohidrati (69,4%), sastoji se također i od proteina (6,3%), masti (5,1%), minerala (3,5%) i vlage (13,1%), a rizom sadrži 1,5-6% eteričnog ulja u kojem dominiraju seskviterpeni. [33,34] Rizom kurkume je bogat izvor ar-turmerona, α -turmerona i β -turmerona, dok su list i cvijet bogati izvori p-cimena, 1,8-cineola, i terpinolena.[34]

Ipak, najvažnija skupina spojeva su kurkuminoidi kojih je do danas identificirano čak 50 te se svrstavaju u 3 skupine: linearne kurkuminoide, cikličke kurkuminoide i kurkuminoide konjugirane s monoterpenima ili seskviterpenima. Linearni kurkuminoidi najčešći su kurkuminoidi koji se nalaze u kurkumi. Tri najvažnija kurkuminoida odgovorna za intenzivnu žutu boju pripadaju skupini linearnih kurkuminoida, a to su kurkumin, demetoksikurkumin i bisdemetoksikurkumin. Svi kurkuminoidi dijele istu karakterističnu strukturu sastavljenu od dva aromatična prstena povezana alifatskim, najčešće heptanskim lancem. Neki kurkuminoidi sadrže 1,3-diketonsku grupu, koja ima najmanje dvije keto-enol tautomerne forme. [35,36]

Postoje dva strukturna izomera kurkumina, prikazana na slici 5., pri čemu je keto tautomer dominantan u neutralnim i kiselim uvjetima, kao i u čvrstom stanju, dok je enolni tautomer dominantan u lužnatim uvjetima. Enolne forme kurkuminoida apsorbiraju UV–Vis svjetlost na 410–430 nm, što im daje narančasto-žutu boju. [36]

Turmeron je terpen koji je termički nestabilan na sobnoj temperaturi i brzo se pretvara u svoj najstabilniji dimerni spoj, ar-turmeron. Turmeron ($C_{15}H_{22}O$) je spoj blijedožućkaste boje koji se može detektirati pri UV svjetlosti valne duljine od 234 nm, dok ar-turmeron ($C_{15}H_{20}O$) je bezbojan te se može detektirati pri UV valnoj duljini od 239 nm. [37]



Slika 5. Shematski prikaz kurkuminoida

Terpenoidi su također neki od glavnih komponenata u ulju kurkume te je eksperimentalno potvrđena prisutnost 62 seskviterpenoida i 4 norseskviterpenoida u ulju kurkume. [35]

Kemijski sastav kurkume je pod utjecajem raznih čimbenika, među kojima su uvjeti u kojima se biljka uzgaja poput tipa tla, klime i načina gnojidbe. Osim toga, vrsta kurkume, vrijeme branja te metode koje se koriste prilikom obrade i čuvanja nakon berbe, također mogu značajno promijeniti kemijski profil kurkume. [38]

1.2.2.2. Ljekovita svojstva kurkume

Povijesna pozadina kurkume počinje na azijskom kontinentu i seže unazad 5000 godina kada se najviše upotrebljavala kao začin jelima. Osim što je začin, kurkuma se također i danas koristi kao izvor pigmenata za bojanje te kao konzervans zbog svojih antioksidativnih svojstava. Budući da su njezina ljekovita svojstva uočena u davnoj povijesti, kurkuma se već tada koristila za liječenje raznih upalnih stanja, kod problema s jetrom i probavnim traktom te kod zacjeljivanja rana. [30,39,40] U 1970-ima, provedeno je prvo istraživanje o zdravstvenim dobrobitima kurkumina. Navedeno istraživanje, ali i sva daljnja istraživanja su potvrdila mnogobrojna ljekovita svojstva kurkume, točnije kurkumina. Većina znanstvenih istraživanja je usmjerena u pravcu proučavanja bioaktivnih učinaka kurkumina jer su utvrđena njegova antitumorska, antioksidativna i protuupalna djelovanja.

Antioksidativni učinak kurkumina je najviše istražen te su mnoga „*in vitro*“ i „*in vivo*“ istraživanja dokazala povezanost kemijske strukture kurkumina i antioksidativnog učinka. Točnije, kurkumin štiti biomembrane od peroksidativnog oštećenja. Poznato je da je peroksidacija lipida lančana reakcija posredovana slobodnim radikalima, koja dovodi do oštećenja staničnih membrana, a inhibicija peroksidacije kurkuminom uglavnom se pripisuje uklanjanju uključenih reaktivnih slobodnih radikala u peroksidaciji. Naime, većina antioksidansa ima ili fenolnu funkcionalnu skupinu ili diketonsku skupinu. No kurkumin je jedinstven antioksidans jer sadrži mnogobrojne funkcionalne skupine, uključujući B-diketonsku skupinu, ugljik-ugljik dvostruke veze i fenilne prstenove sa različitim hidroksil i metoksil supstituentima. [41]

S druge strane, kako kronična upala može biti uzrokovana oksidativnim stresom, tako postaje sve jasniji odnos između antioksidativnog učinka kurkumina i njegovog potencijala za suzbijanje upala. Kurkumin ima sposobnost reguliranja ekspresije NF- κ B, (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) vrstu transkripcijskog faktora koji regulira izražavanje gena uključenih u upalne procese, imunosni odgovor i stanični rast. Aktivacija NF- κ B dovodi do proizvodnje proupalnih citokina, stoga inhibicijom aktivacije NF- κ B, kurkumin smanjuje upalne procese u tijelu i na taj način sudjeluje u regulaciji upalnih odgovora. [42]

Istraživanja su pokazala da kurkumin može imati nekoliko mehanizama djelovanja koja doprinose njegovim antitumorskim učincima, što obuhvaća i protuupalno i antioksidativno djelovanje. Kurkumin je u istraživanjima pokazao da sprječava karcinogenezu utječući na dva procesa: angiogenezu i rast stanica raka. [39,43] Također suzbija metastaziranje stanica raka i inducira apoptozu stanica raka, odnosno programiranu staničnu smrt koja se normalno javlja u tijelu s ciljem uklanjanja oštećenih ili nepotrebnih stanica. Međutim, u slučaju raka, stanice često izbjegavaju apoptozu i neprekidno se dijele, te u tom slučaju, kurkumin igra ključnu ulogu u njihovom uklanjanju. [44]

Dakako, s obzirom da se oksidativna oštećenja povezuju sa mnogim drugim patološkim stanjima, kurkumin, uz sve navedeno, ima učinak i na proces starenja, neurodegenerativne bolesti i ateroskleroze. Kao rezultat toga, u primjeni kurkumina najvažniju ulogu ima farmaceutska industrija, posebice sektor usmjeren na razvoj antitumorskih lijekova, dok je slijede prehrambena i kozmetička industrija. Kurkumin se koristi u mnogim kozmetičkim pripravcima protiv starenja, a smatra se da će upotreba ayurvedskih proizvoda za njegu lica tek

doživjeti svoj globalni i ekonomski uspjeh. Istraživanje *Grand View Researcha, Inc.*, predviđa rast globalne veličina tržišta kurkumina na 1,30 milijardi USD do 2024. godine. [45,46]



Slika 6. Shematski prikaz potencijalnih bioloških svojstava kurkumina

1.3. METODE EKSTRAKCIJE ETERIČNIH ULJA

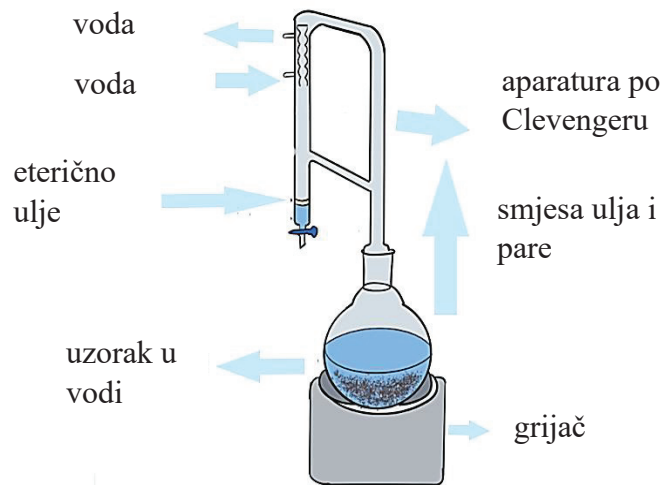
Postoji nekoliko metoda ekstrakcije koje se koriste za dobivanje eteričnih ulja iz biljnih sirovina. Važno je napomenuti da odabir metode ekstrakcije znatno ovisi o biljnoj sirovini, specifičnim svojstvima spojeva i željenoj kvaliteti eteričnog ulja. Ove metode se mogu podijeliti u dvije kategorije:

- Konvencionalne ili klasične metode: metode ekstrakcije korištene već duže vrijeme i tradicionalno primjenjivane u proizvodnji eteričnih ulja, a pod njih se svrstavaju navedene metode:

- Hidrodestilacija
 - Odnosenje vodenom parom
 - Parna hidrodestilacija
 - Parna destilacija
 - Hidrodifuzija
 - Ekstrakcija organskim otapalom
 - Soxhlet ekstrakcija
 - Hladno prešanje
- Napredne ili inovativne metode: s razvojem tehnologije, razvijene su nove metode ekstrakcije koje omogućuju poboljšanu učinkovitost i povećanu kvalitetu eteričnih ulja, a pod njih se svrstavaju sljedeće metode:
 - Ekstrakcija superkričnim fluidima
 - Ekstrakcija subkričnim fluidima
 - Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom
 - Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima
 - Trenutni kontrolirani pad tlaka

1.3.1. Hidrodestilacija

Hidrodestilacija je jedna od najčešće upotrebljvanih metoda ekstrakcije biljnih spojeva i dobivanje eteričnog ulja iz biljne sirovine. Ova metoda koristi princip destilacije i vodu kao otapalo. Usitnjena biljna sirovina se postavlja u tikvicu s vodom i staklenim kamenčićima ukoliko je vrenje burno te se zagrijava do točke vrenja. Zagrijavanje uzrokuje isparavanje biljnih komponenti iz tikvice zajedno s vodom. Kao rezultat toga, nastaje para koja sadrži aromatične spojeve. Nakon toga slijedi kondenzacija u kondenzatoru, a potom se kapljevita smjesa preusmjerava u dekanter ili separator. Postoje brojne izvedbe aparatura za hidrodestilaciju, a standardne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura prema Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji aparatura i prema Clevengeru. [47]



Slika 7. Shematski prikaz aparature po Clevengeru

1.3.2. Odnosenje vodenom parom

Odnosenje vodenom parom je metoda koja se često upotrebljava u industriji te počiva na sličnom principu poput hidrodestilacije, no ne ostvaruje se izravni kontakt između vode i biljne sirovine. Biljna sirovina se postavlja na rešetku iznad vode, a zatim se voda zagrijava do točke vrenja. Isparavanjem vode i njezinim prolaskom kroz biljnu sirovinu ravnomjerno raspoređenu na rešetci, dolazi do vezanja aromatskih spojeva za paru. U kondenzatoru potom slijedi kondenzacija vodene pare, pri čemu se tvari povezane s parom vraćaju u tekuću fazu. [48]

Postoje tri načina odnošenja vodenom parom, a to su:

- Parna hidrodestilacija
- Parna destilacija
- Hidrodifuzija

1.3.3. Ekstrakcija organskim otapalom

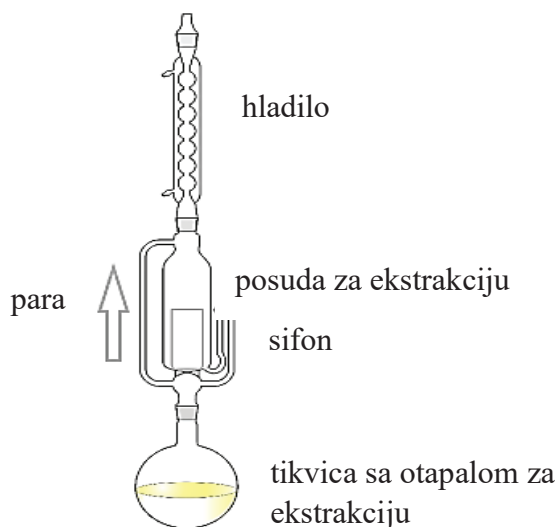
Ekstrakcija organskim otapalom primjenjuje se za izdvajanje biljnih spojeva iz biljne sirovine pomoću organskog otapala polarnog ili nepolarnog karaktera. Usitnjenu biljnu sirovinu potapa se u otapalo kako bi se ostvario što bolji kontakt i time bolja ekstrakcija te se potom sadržaj posude zagrijava. Nakon toga potrebno je provesti filtraciju, a potom se filtrat koncentrira ispravljanjem otapala. U ovoj metodi važan korak je odabir pogodnog otapala za

ekstrakciju željenih tvari iz biljnog materijala. Najčešća otapala za ekstrakciju su aceton, *n*-heksan, metanol, etanol i petrolejski eter. Unatoč tome što se određena organska otapala smatraju otrovnim, ova je metoda jednostavna, efikasna i jeftina te radi toga i široko primijenjena u raznim industrijskim granama.

1.3.4. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija, ime je dobila po svom izumitelju Franzu von Soxhletu 1897. godine, čijim doprinosom je ekstrakcija znatno poboljšana te je danas neophodna tehnika u raznim industrijskim postrojenjima i kemijskim laboratorijima za izdvajanje fitokemikalija. Vrlo je korisna za izolaciju organskih spojeva slabo topivih u organskim otapalima pri sobnoj temperaturi.

Osnovni princip Soxhlet ekstrakcije je kontinuirani ciklus isparavanja i kondenzacije otapala kako bi se izolirale ključne tvari iz uzorka. Soxhlet aparatura se sastoji od tikvice na dnu, staklenog spremnika sa sifonom i poroznim tuljcem, hladila i grijača. Uzorak se postavlja u porozni tuljac, a u tikvicu je potrebno staviti odgovarajuće otapalo. Sadržaj tikvice se potom zagrijava do temperature vrenja što rezultira isparavanjem otapala. Nastala para kondenzira u hladilu i natapa uzorak. Nakon određenog vremena, ciklus završava povratom otapala i ekstrahiranih komponenata nazad u tikvicu. Proces se kontinuirano nastavlja odvijati, što povećava učinkovitost same metode. Uz navedeno, postupak provedbe je vrlo jednostavan, aparatura je relativno jeftina i ne zahtijeva kontinuirano nadgledanje jer sustav ostaje na visokoj temperaturi i omogućuje samostalno odvijanje ekstrakcije.



Slika 8. Soxhletov uređaj

1.3.5. Hladno prešanje

Hladno prešanje je proces ekstrakcije ulja iz sjemenki ili plodova biljaka bez upotrebe visokih temperatura i otapala u svrhu očuvanja hranjivih sastojaka, a time i kvalitete ulja. Riječ je o mehaničkoj metodi karakterističnoj za ekstrakciju eteričnog ulja iz kore agruma. [47] Biljni materijal se preša pri sobnoj temperaturi kako bi se izdvojilo eterično ulje koje se potom odnosi hladnom vodom. Centrifugiranjem dolazi do odvajanja ulja od vode. Glavna prednost ove metode je što ne zahtijeva upotrebu organskih otapala i drugih kemikalija, čime je dobiveni produkt u skladu sa načelima “zelene” kemije.

1.3.6. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

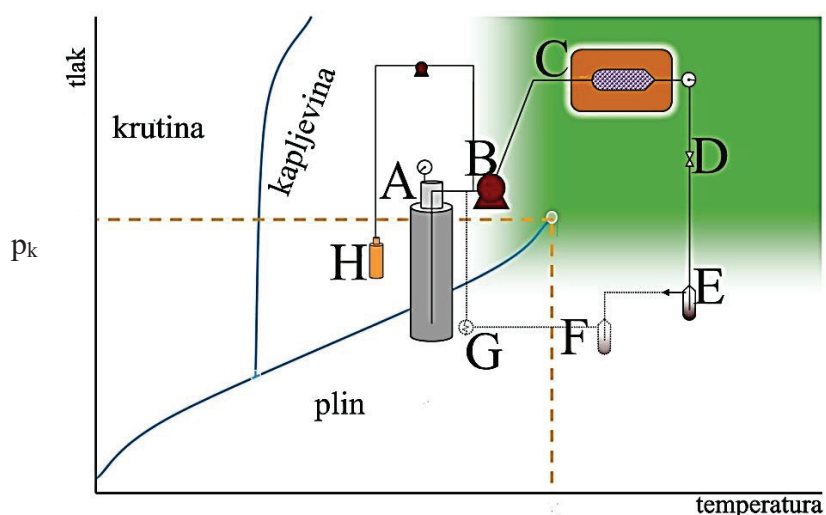
Superkritični fluidi se odlikuju viskoznošću bliskom plinovima i gustoćom bliskom kapljevinama. Također mogu difundirati kroz porozne strukture poput plinova i imaju sposobnost otapanja raznovrsnih tvari. [48] Navedene spoznaje su iskorištene u svrhu unaprjeđenja ekstrakcije, odnosno razvitka ekstrakcije superkritičnim fluidima. Ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) je metoda koja se temelji na korištenju otapala na temperaturama i tlakovima iznad njihovih kritičnih točaka. Provodi se pomoću ekstraktora prikazanog na slici 9. Riječ je o brznoj, selektivnoj i učinkovitoj metodi koja je prigodna za ekstrakciju biljnih spojeva iz biljnog materijala. [49]

Ekstrakcijski postupak se dijeli u 3 faze:

1. faza difuzije - superkritično otapalo difundira u matricu i smanjuje otpor prijenosu tvari. U ovoj fazi superkritično otapalo dolazi u kontakt s materijalom te prodire u njega.
2. faza otapanja - topljive komponente se otapaju u superkritičnom fluidu i dalje se prenose difuzijom, prvo na površinu čvrstog materijala, a zatim u volumen tekuće faze superkritičnog fluida.
3. faza uklanjanja iz ekstraktora - proces ekstrakcije završava transportom otopljene tvari i superkritičnog fluida iz ekstraktora na daljnju obradu ili korištenje. [49]

Iako sve tvari imaju kritičnu točku, nisu sve pogodne za opisanu ekstrakciju. Ugljikov dioksid je nedvojbeno najčešće korišten u ekstrakciji superkritičnim fluidima zbog niske cijene i ekološke prihvatljivosti. Uz navedeno, prednost mu je i što je u plinovitom stanju pri sobnoj temperaturi, kemijski je inertan, nezapaljiv te se lako postižu kritični uvjeti. [48,49,50]

Prednost ove metode ekstrakcije je jednostavna promjena radnih uvjeta čime se kontrolira otapanje tvari, odnosno selektivnost metode. Uz to, manja energetska potreba u odnosu na tradicionalne metode ekstrakcije, i obnovljivost korištenog CO₂ ovu metodu čini vrlo popularnom u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.



Slika 9. Shema tipičnog ekstraktora superkritične tekućine preklapa se s faznim dijagramom CO₂. Različiti dijelovi SFE označeni su kao cilindar s tekućim CO₂ (A), pumpa za CO₂ (B), grijana ćelija za ekstrakciju (C), statički/dinamički ventil (D), spremnik za sakupljanje 1 (E), spremnik za sakupljanje 2 (F), sustav za recikliranje CO₂, te spremnik za modifikator (H).

[49]

1.3.7. Ekstrakcija subkritičnim fluidima

Subkritično stanje je stanje u kojem je tlak fluida viši od kritičnog tlaka, ali je temperatura niža od kritične temperature, ili obrnuto. U ovom stanju, najčešće se za ekstrakciju koristi voda ili ugljikov dioksid. Subkritični fluidi imaju nisku viskoznost, gustoću blisku gustoći kapljevine te difuzivnost između plina i kapljevine, što ih čini pogodnim za ekstrakciju eteričnih ulja. [48,50]

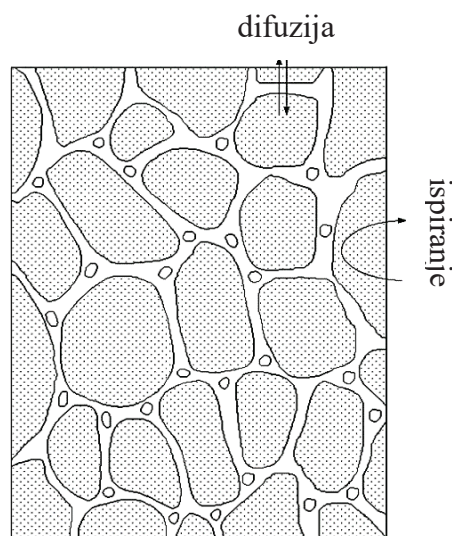
Budući da ova metoda koristi niže temperature i tlakove, proces je energetski manje zahtjevan, stoga je moguće smanjiti troškove proizvodnje odabirom navedene metode. Osim toga, subkritični fluidi nisu toksični ni štetni za okoliš za razliku od konvencionalnih otapala te se radi toga smatraju vrlo korisnom zelenom alternativnom metodom ekstrakcije. Ipak,

najvažnije prednosti ove metode u odnosu na tradicionalne tehnike ekstrakcije obuhvaćaju kraće vrijeme ekstrakcije, veću kvalitetu ekstrakta i nisku potrošnju otapala. [51]

1.3.8. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom razvijena je 1950. godine, a danas se svrstava u inovativne metode ekstrakcije za učinkovito izdvajanje tvari primjenjujući kombinaciju ultrazvučnih valova i ekstrakcijskih otapala. Naime, ultrazvuk omogućuje intenzivniju i selektivniju ekstrakciju eteričnog ulja te ubrzava njegovo oslobađanje iz biljnog materijala. [52]

Mehanizam ekstrakcije uključuje dvije vrste fizičkih fenomena: difuziju kroz stanične stijenke i ispiranje sadržaja stanice nakon što su stijenke oštećene, slika 10. Ultrazvučni valovi značajno utječu na oba fenomena. Osim toga, ultrazvuk olakšava ekstrakciju jer biljni materijal sadrži žlijezde ispunjene eteričnim uljem i obavijene tankom stijenkom koju je vrlo lako uništiti sonifikacijom.



Slika 10. Shematski prikaz difuzije kroz stanične stijenke i ispiranje sadržaja stanice

Učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom može se povećati usitnjavanjem biljnog materijala. Usitnjavanje rezultira povećanjem kontakta između površine biljnog materijala i otapala, ali i boljom interakcijom između ultrazvučnih valova i tvari unutar materijala, omogućavajući time bržu i učinkovitiju ekstrakciju željenih tvari. [53]

Važna pojava u ultrazvučnoj potpomognutoj ekstrakciji je kavitacija. Kavitacija je pojava u ultrazvučnoj ekstrakciji u kapljevitoj fazi kojom nastaju kavitacijski mjehurići zbog promjene tlaka i temperature. Čim dosegnu kritičnu vrijednost, dolazi do implodije mjehurića što rezultira porastom temperature, tlaka i brzine strujanja. Dakle, nastaje lokalno turbulentno strujanje čime se povećava prijenos tvari. Isti efekt može nepovoljno utjecati na termički nestabilne tvari. Stoga, optimizacija radnih uvjeta ima važnu ulogu za efektivno izdvajanje tvari. [54]

1.3.9. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi predstavljaju segment elektromagnetskog spektra s frekvencijom između 300 MHz i 30 GHz, te valnim duljinama u rasponu od 1 cm do 1 m. Najčešće korištena frekvencija u praksi je 2450 MHz, što odgovara valnoj duljini od približno 12,2 cm. [48]

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je metoda za ekstrakciju aktivnih komponenti iz biljnog materijala korištenjem mikrovalne energije za zagrijavanje otapala koja sadrže uzorke, čime analiti iz matrice uzorka prelaze u otapalo. Učinkovitost navedene metode ovisi o svojstvima otapala, biljnom materijalu i komponentama koje se ekstrahiraju, posebice njihovim dielektričnim konstantama. [54]

1.3.10. Trenutni kontrolirani pad tlaka

Trenutni kontrolirani pad tlaka (francuski akronim: DIC, za “Détente Instantané Contrôlée”) izumili su znanstvenici Allaf i Vidal 1981. godine. Ovaj postupak započinje brzim zagrijavanjem na visoku temperaturu, nakon čega slijedi naglo smanjenje tlaka prema vakuumu. Naglim smanjenjem tlaka, plinovite komponente poput eteričnih ulja, imaju tendenciju da ekspandiraju i izlaze iz biljnog materijala. Prednosti trenutnog kontroliranog pada tlaka su sljedeće:

- brza i učinkovita ekstrakcija
- visok prinos
- selektivna ekstrakcija
- smanjenje degradacije termički nestabilnih spojeva
- smanjenje količine korištenog otapala

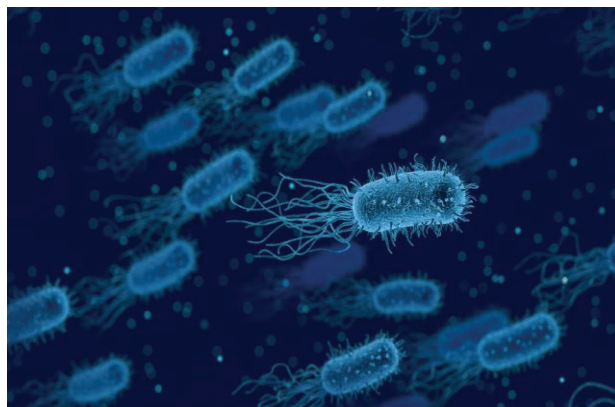
1.4. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja jedan je od ključnih postupaka u kemijskoj industriji. Disk difuzijski test je često korištena metoda za procjenu antimikrobne aktivnosti tvari da inhibiraju rast mikroorganizama, uključujući eterična ulja. U ovom radu, provedeno je ispitivanje antimikrobne aktivnosti eteričnog ulja koristeći sljedeće mikroorganizme:

- bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)
- kvasac *Candida lipolytica* (*C. lipolytica*) .

1.4.1. *Escherichia coli*

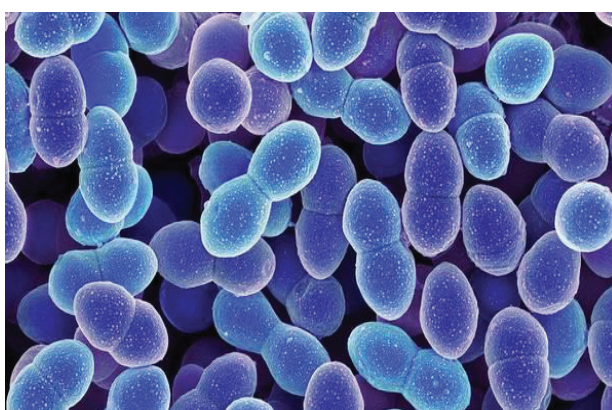
Escherichia coli (slika 11.) je gram-negativna štapičasta bakterija koja pripada skupini *Enterobacteriaceae*. Fakultativni je anaerob, pokretna je i ne stvara spore te obitava u probavnom traktu sisavaca. Dio je normalne crijevne flore te sudjeluje u probavi, no u određenim slučajevima može biti patogena. [55] Postoje dvije glavne skupine sojeva bakterije *E. coli*. Prva skupina obuhvaća komenzalne sojeve koji se normalno nalaze u crijevnoj flori te ne predstavljaju prijetnju zdravoj jedinci. Drugu skupinu čine patogeni sojevi koji mogu izazvati crijevne i izvancrijevne infekcije. [56] U uobičajene načine zaraze bakterijom *E. coli* svrstava se konzumacija kontaminirane hrane, posebno sirovo ili nedovoljno termički obrađeno meso, konzumacija kontaminirane vode i nepridržavanje higijenskih mjera.



Slika 11. *Escherichia Coli* [57]

1.4.2. *Enterococcus faecalis*

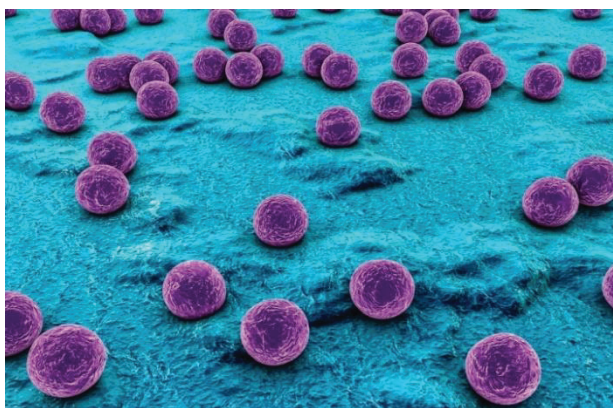
Enterococcus faecalis (slika 12.) je gram-pozitivna bakterija kuglastog oblika te je dio crijevne mikroflore, osobito probavnog trakta životinja i ljudi. Pronalaze se u beskralješnjacima, kukcima i sisavcima što ukazuje na sposobnost enterokoka da preživi raznolike uvjete. Enterokoki posjeduju rezistenciju na cefalosporine, klindamicin i kombinaciju trimetoprima i sulfametoksazola, dok imaju nizak stupanj rezistencije na penicilin, ampicilin i aminoglikozide. Osim toga, enterokoki imaju visoku sposobnost razvijanja novih mehanizama rezistencije pa je potrebno kontrolirati upotrebu antibiotika. [58]



Slika 12. *Enterococcus faecalis* [59]

1.4.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (slika 13.) je gram-pozitivna bakterija široko rasprostranjena u prirodi i može se pronaći na koži i sluznicama ljudi i životinja. Ova bakterija je fakultativni anaerob i stanovnik je normalne flore, ali i uzročnik različitih infekcija. *S. aureus* može uzrokovati niz bolesti, od manjih kožnih infekcija do opasnih bolesti kao što su upala pluća, meningitis, osteomijelitis, endokarditis, sindrom toksičnog šoka, bakterijemija i sepsa. [60]



Slika 13. *Staphylococcus aureus* [61]

1.4.4. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis (slika 14.) je aerobna gram-pozitivna bakterija koja se često nalazi u tlu, ali i u drugim prirodnim okruženjima. Prepoznatljivog su štapićastog oblika, a kreću se peritrihijalnim bičevima. Ove bakterije imaju mogućnost stvaranja spora radi čega može preživjeti nepovoljne uvjete, ali su nepatogene. Koristi se kao modelni organizam zahvaljujući svojoj prirodnoj sposobnosti da unese izvanstaničnu DNA koja omogućuje jednostavnu genetsku modifikaciju. [62] *B. subtilis* se smatra sigurnom bakterijom za ljudsku upotrebu, te je korištena u probioticima i dodacima prehrani zbog svojih potencijalnih zdravstvenih dobrobiti.



Slika 14. *Bacillus subtilis* [63]

1.4.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (slika 15.) je aerobna, gram-negativna bakterija koja se često nalazi u vodenim okolišima. Poznata je kao oportunistički patogen, što znači da uzrokuje

infekcije kod osoba s oslabljenim imunološkim sustavom. *P. aeruginosa* je posebna zbog otpornosti i sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima, kao što je primjerice nedostatak hranjivih tvari. Važno je napomenuti da je također jedna od najčešće izoliranih bolničkih patogena koji uzrokuje brojne infekcije povezane s visokom stopom smrtnosti. [64]



Slika 15. *Pseudomonas aeruginosa* [65]

1.4.6. *Candida lipolytica*

Candida lipolytica ili *Yarrowia lipolytica* (slika 16.) je kvasac iz roda *Candida* koja obitava u različitim okolišima i prehrambenim proizvodima. Ova vrsta je poznata po svojoj sposobnosti razgradnje lipida, što je korisno u različitim industrijskim primjenama. Iako se *C. lipolytica* ranije smatrala nisko virulentnom, sve je više zabilježenih slučajeva infekcije čiji uzročnik je upravo navedeni kvasac, posebno kod osoba s oslabljenim imunološkim sustavom. *C. lipolytica* najbolje raste u uvjetima s visokim sadržajem masti i lipida te na umjerenim temperaturama, u rasponu od 20 do 30 ° C. [66,67]



Slika 16. *Candida lipolytica* [68]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. PLAN I PROVEDBA EKSPERIMENTA

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj kvalitete đumbira i kurkume i metode provedbe ekstrakcije na kvalitetu dobivenih ekstrakata. Dobiveni ekstrakti podvrgnuti su kvalitativnoj i kvantitativnoj karakterizaciji primjenom tankoslojne kromatografije, plinske kromatografije spojene s masenom spektrometrijom, infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom, UV-Vis spektroskopijom te je provedeno ispitivanje antimikrobne aktivnosti disk-difuzijskom metodom. Plan rada je obuhvaćao:

- Ekstrakciju eteričnog ulja đumbira i kurkume hidrodestilacijom
- Dobivanje ekstrakata đumbira i kurkume maceracijom
- Dobivanje ekstrakata đumbira i kurkume pomoću Soxhlet uređaja
- Dobivanje ekstrakata đumbira i kurkume ultrazvučnom maceracijom
- Dobivanje ekstrakata đumbira i kurkume pomoću magnetske miješalice
- Provođenje kvalitativne i kvantitativne analize uzoraka ekstrakata kromatografskim i spektroskopskim metodama
- Provođenje ispitivanja antimikrobne aktivnosti uzoraka ekstrakta disk-difuzijskim testom

2.2. KEMIKALIJE

Za izvođenje eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije:

Otapala:

- *n*-heksan, HiPerSolv CHROMANORM
- 96% etanol, KEFO

Pomoćne kemikalije:

- Destilirana voda
- Bezvodni Na₂SO₄

Radni materijal:

- Đumbir (lat. *Zingiber officinale*), kupljen u maloprodajnoj trgovini *Garden* u Zagrebu, uvezen iz Perua
- Kurkuma (lat. *Curcuma longa*), kupljena u maloprodajnoj trgovini *Garden* u Zagrebu, uvezen iz Perua

2.3. INSTRUMENTI

- Plinski kromatograf sa spektrometrijom masa, Agilent 7890B/5977
- UV/VIS spektrometar, Shimadzu UV-1280
- Ultrazvučna kupelj
- Magnetska miješalica, Witeg MSH-20D
- Infracrveni sušionik, Kern
- Infracrveni spektrofotometar s Fourierovom transformacijom signala, Bruker Vertex 70

2.4. PRIPREMA UZORAKA

Đumbir i kurkuma su kupljeni u maloprodajnoj trgovini u Zagrebu te je prije izvođenja eksperimenta bilo potrebno temeljito oprati biljni materijal pod mlazom hladne vode, potom obrisati i jednolično usitniti pomoću ribeža. Biljni materijal bilo je potrebno usitniti kako bi se povećala površina izložena ekstrakcijskom otapalu. Time je omogućeno efikasnije izdvajanje aktivnih komponenti iz đumbira i kurkume. Usitnjeni komadići korišteni su izravno u metodama ekstrakcije ili su prethodno podvrgnuti infracrvenom sušenju ili sušenju na zraku.

2.5. HIDRODESTILACIJA

Ekstrakcija eteričnih ulja đumbira i kurkume hidrodestilacijom provedena je na 4 uzorka đumbira i 3 uzorka kurkume služeći se aparaturom prema Clevengeru, prikazanoj na slici 17. Hidrodestilacija se provodila na svježem biljnom materijalu, sušenom na zraku 24 sata te sušenom u infracrvenom sušioniku. Nakon dodavanja zadanih masa uzoraka prikazanih u tablici 1., potrebno je bilo nadopuniti tikvicu sa 750 mL destilirane vode te ubaciti staklene kamenčiće radi smanjenja burnog vrenja. Također je provedena jedna hidrodestilacija svježeg

đumbira sa 500 mL destilirane vode u tikvici zapremnine 1 L. Tikvica zapremnine 2 L ili 1 L postavljena je na električni grijač te je obavijena aluminijskom folijom kako bi se spriječio gubitak topline. Postupak hidrodestilacije se provodio 4 (đumbir) ili 3 sata (kurkuma), s time da se vrijeme počelo bilježiti od vremena pojave prve kapi destilata. Nakon završene destilacije, volumen ekstrahiranog ulja se očitavao na graduiranom dijelu aparature, a zatim se ulje prenosilo u epruvetu. Da bi se uklonio eventualni višak vode, bilo je potrebno dodati malu količinu bezvodnog natrijevog sulfata. Nakon toga, uzorci su se pohranili u hladnjak.

Tablica 1. Metode obrade biljnog materijala, mase uzoraka i volumen destilirane vode korištene u hidrodestilaciji

Metoda obrade biljnog materijala	Masa đumbira, g	Masa kurkume, g	Volumen destilirane vode, mL
Svježi	100	100	750
Sušena zraku 24 h	56,73	56,73	750
Osušeni	38,36	38,36	750
Svježi	200	/	500



Slika 17. Aparatura po Clevengeru za hidrodestilaciju

2.6. SOXHLET EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija pomoću Soxhlet uređaja, prikazanog na slici 18., provodila se na 3 uzorka đumbira i 3 uzorka kurkume u trajanju od 3 h od pojave prve kapi destilata. Primijenjen je proces ekstrakcije na svježem đumbiru koristeći etanol i *n*-heksan, dok je za suhi đumbir upotrijebljen samo *n*-heksan. Kurkuma je također bila podvrgnuta ekstrakcijskom postupku u identičnim uvjetima. Korištene mase biljnog materijala prikazane su u tablici 2. Biljni materijal je postavljen u posudu za ekstrakciju iznad tikvice sa 250 mL odabranog otapala. Nakon provedene ekstrakcije đumbira, potrebno je bilo profiltrirati dobivenu otopinu i provesti isparavanje otapala u rotavaporu.



Slika 18. Ekstrakcija đumbira (lijevo) i kurkume (desno) pomoću Soxhlet uređaja

Tablica 2. Metode obrade biljnog materijala i mase u odabranim otapalima prilikom Soxhlet ekstrakcije

Metoda obrade biljnog materijala	Masa đumbira, g	Masa kurkume, g	Otapalo za ekstrakciju
Svježi	60	60	<i>n</i> -heksan
Svježi	60	60	etanol
Osušeni	20	20	<i>n</i> -heksan

2.7. MACERACIJA

Maceracija se provodila na 2 uzorka đumbira i 2 uzorka kurkume, slika 19. Prvi uzorak svježeg đumbira imao je masu od 60 g te je stavljen u posudu sa 250 mL etanola kao ekstrakcijskog otapala. Drugi uzorak se sastojao također od svježeg đumbira mase 60 g, ali je korišteno otapalo bilo *n*-heksan u tom slučaju. Maceracija kurkume je provedena pri istim uvjetima. Trajanje maceracije iznosilo je 72 h uz povremeno miješanje, čime se omogućio bolji kontakt biljnog materijala i otapala, potičući time efikasniju ekstrakciju. Nakon maceracije, slijedila je filtracija preko filter papira.



Slika 19. A) maceracija kurkume u heksanu (lijevo) i etanolu (desno) i **B)** maceracija đumbira u etanolu (lijevo) i heksanu (desno)

2.8. EKSTRAKCIJA UZ MAGNETSKO MIJEŠANJE

Ekstrakcija pomoću magnetske miješalice, prikazana na slici 20., provodila se pri dvije temperature: sobnoj temperaturi i temperaturi od 50 °C. Korištena su dva različita otapala, etanol i *n*-heksan. U svaku posudu stavljeno je 17,91 g svježeg đumbira ili kurkume i 50 mL odabranog otapala. Vrijeme ekstrakcije iznosilo je 30 minuta. Nakon ekstrakcije, slijedila je filtracija dobivene suspenzije.



Slika 20. A) Ekstrakcija svježe kurkume u *n*-heksanu pri 50 °C i **B)** ekstrakcija svježeg đumbira u *n*-heksanu pri 50 °C u *n*-heksanu (lijevo) i u etanolu pri 50 °C (desno)

2.9. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provodila se u etanolu pri 25 °C i 50 °C u trajanju od 30 minuta te je prikazana na slikama 21 i 22. Ekstrakcija je provedena sa svježim i suhim uzorcima đumbira i kurkume. Svježi đumbir je nariban na sitne komadiće, izvagana je masa od 17,91 g te je stavljen u posudu sa 50 mL etanola. Isti postupak je ponovljen za suhi đumbir, sa iznimkom pri uzorku suhog đumbira namjenjenog za 50 °C. U tom slučaju je korištena manja masa uzorka, ali je zadržan omjer otapala i uzorka. Kurkuma je također podvrgnuta istom postupku. Nakon postupka ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka, uslijedila je filtracija suspenzija.



Slika 21 i 22. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

2.10. ANALITIČKE METODE

2.10.1. Tankoslojna kromatografija (TLC)

Analizirano je nekoliko ekstrakata đumbira i kurkume dobivenih različitim metodama ekstrakcije koristeći tankoslojnu kromatografiju kao metodu kvalitativne kemijske analize. Za nepokretnu fazu korištena je Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC ploča, a za pokretnu fazu kod kromatografiranja kurkume korištena je smjesa toluena i etilacetata u volumnom omjeru 93:7. Pokretna faza za đumbir činio je heksan i eter u volumnom omjeru 40:60. Pripremljen je uzorak za kromatografiranje otapanjem 20 µl eteričnog ulja u 1,0 mL toluena. Nakon toga, potrebno je bilo pripremiti referentne sastavnice eteričnog ulja otapanjem u toluenu. Eukaliptol je pripremljen na isti način kao i uzorci ekstrakata, a referentna otopina za đumbir pripremljena je otapanjem 10 µl citrala i 10 mg rezorcinola u 10 ml prethodno pripremljene otopine metanola.

Uzorke i referentne sastavnice potom se nanosilo na ploču i postavilo u kadu sa prikladnim otapalima do dostizanja fronte otapala. Ploču je bilo potrebno ostaviti na sušenju nekoliko minuta, a zatim poprskati prethodno pripremljenim reagensima za detekciju. Korištena je smjesa anisaldehida i sumporne kiseline, miješanjem 0,5 mL anisaldehida s 10 mL ledene octene kiseline, 85 mL metanola i 5 mL koncentrirane sulfatne kiseline te vanilin-sulfatna kiselina. Nakon prskanja zadanim otopinama, ploču je potrebno staviti u sušionik na 110 °C do razvitka kromatograma.

2.10.2. Plinska kromatografija s masenom spektroskopijom (GC-MS)

Eterična ulja dobivena metodom destilacije podvrgnuta su analizi u spregnutom sustavu plinske kromatografije sa spektrometrijom masa koristeći se uređajem Agilent 7890B/5977A. Za analizu, uzorci su pripremljeni otapanjem eteričnog ulja u *n*-heksanu u omjeru 1:100, a zatim je 1 µL uzorka injektirano u *split modu* s omjerom 1:50. Kao plin nosioc koristio se helij s protokom od 1 mL/min.

Sastojci eteričnog ulja razdvojeni su koristeći kapilarnu kolonu HP-5ms (s 5% fenilmetilpolisiloksana) duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma od 0,25 µm. Tijekom analize primijenjen je sljedeći temperaturni program: početna temperatura kolone iznosila je 60 °C u trajanju od 1 minute, nakon čega je slijedilo zagrijavanje brzinom od 3 °C/min do 200 °C. Temperatura kolone je potom održavana na 200 °C tijekom 10 minuta.

Nakon odvajanja, sastojci eteričnog ulja su analizirani na masenom spektrometru pri energiji udara od 70 eV i rasponu m/z od 40 do 400. Obrada rezultata provedena je korištenjem računalnog paketa Agilent GC/MSD ChemStation verzija F.01.03. Identifikacija komponenti eteričnog ulja provedena je usporedbom masenih spektara s bazama podataka NIST 14, Wiley 9 i HPCH 2205. Na slici 23. prikazan je spomenuti uređaj.



Slika 23. Plinski kromatograf sa spektrometrijom masa (GC-MS)

2.10.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

Analiza infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom za uzorke ekstrakata đumbira i kurkume provedena je snimanjem na uređaju Bruker Vertex 70 u rasponu od 4000 do 400 cm^{-1} . Iz dobivenog spektra identificiraju se određene funkcionalne skupine karakteristične za ispitivani uzorak. Na slici 24. prikazan je spomenuti uređaj korišten za snimanje spektara.



Slika 24. Infracrveni spektrofotometar s Fourierovom transformacijom signala

2.10.4. UV/Vis spektrofotometrija

Za analizu uzorka spektrometrijskom metodom koristio se Shimadzu UV-1280 UV/Vis spektrofotometar, prikazan na slici 25. Provedeno je snimanje spektara ekstrakta đumbira u rasponu valnih duljina od 190-350 nm, a kurkuminih ekstrakata u rasponu valnih duljina od 300-500 nm. Za određivanje koncentracije aktivnih spojeva u ekstraktu đumbira, pripremljene su standardne otopine i izrađena je kalibracijska krivulja na temelju apsorpcijskih vrijednosti pripremljenih otopina.



Slika 25. UV/Vis spektrofotometar

2.11. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

U sklopu ovog rada, napravljena je mikrobiološka analiza odabranih ekstrakata đumbira i kurkume disk-difuzijskim testom. Za analizu su upotrijebljene bakterijske kulture *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, kao i kvasac *Candida lipolytica*. Navedeni mikroorganizmi su izolirani iz okoliša i korišteni za procjenu sposobnosti inhibicije ekstrakta.

Prvi korak u provedbi disk difuzijskog testa je priprema sterilne hranjive podloge u Erlenmeyerovim tikvicama. Za bakterijski uzgoj korišten je hranjivi agar, dok je za kvasac korišten malt agar. Priprema hranjivih podloga provodila se prema uputama proizvođača Biolife Manual, drugo izdanje, Ingraf, Italija, 1991. Za testiranje osjetljivosti korištena je Mueller Hinton Broth podloga. Nakon pripreme podloga, uslijedila je homogenizacija prije zagrijavanja do vrenja. Podloge su sterilizirane u autoklavu pri temperaturi od 120 °C i tlaku od 1,1 atm u trajanju od 15 minuta.

Disk-difuzijski test provodi se prema standardom postupku NCCLS *disc diffusion method* (CLSI, 2012). Potrebno je bilo otpipetirati 0,1 cm³ pripremljenih suspenzija kulture mikroorganizma u Petrijevu zdjelicu na Mueller Hinton Broth podlogu i i homogenizirati pomoću štapića po Drigalskom. Nakon toga postavljeni su diskovi promjera 6 mm na površinu hranjive podloge na koje se potom otpipetira 25 µL ekstrakta. Petrijeve zdjelice s agarovim podlogama i diskovima zatim su postavljene u inkubator s optimalnim uvjetima za rast mikroorganizama, odnosno na temperature od 37 °C u trajanju od 24 sata. S druge strane, Petrijeva posuda koja sadrži kulturu kvasca podvrgnuta je inkubaciji u trajanju od 48 sati na temperaturi od 28 °C.



Slika 26. Postupak homogenizacije pripremljenih suspenzija kultura pomoću štapića po Drigalskom

3. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ovog rada provedeni su eksperimenti s kurkumom i đumbirom kako bi ustanovila kvaliteta dobivenih ekstrakata prilikom primjene različitih postupaka predobrade, različitih ekstrakcijskih otapala, kao i metoda ekstrakcije. Nakon provedenih eksperimenata, prikupljeni su rezultati koji uključuju kvantitativne podatke o sadržaju bioaktivnih spojeva u ekstraktima, kao i njihovu kvalitativnu analizu putem spektrometrijskih i kromatografskih tehnika. Rasprava će dati uvid u optimalnu kombinaciju postupaka obrade, odabranih otapala i metoda ekstrakcije kako bi se postigla što veća kvaliteta ekstrakata.

3.1. HIDRODESTILACIJA

3.1.1. Prinos eteričnog ulja

Tablica 3. Karakteristike i rezultati hidrodestilacije za kurkumu i đumbir

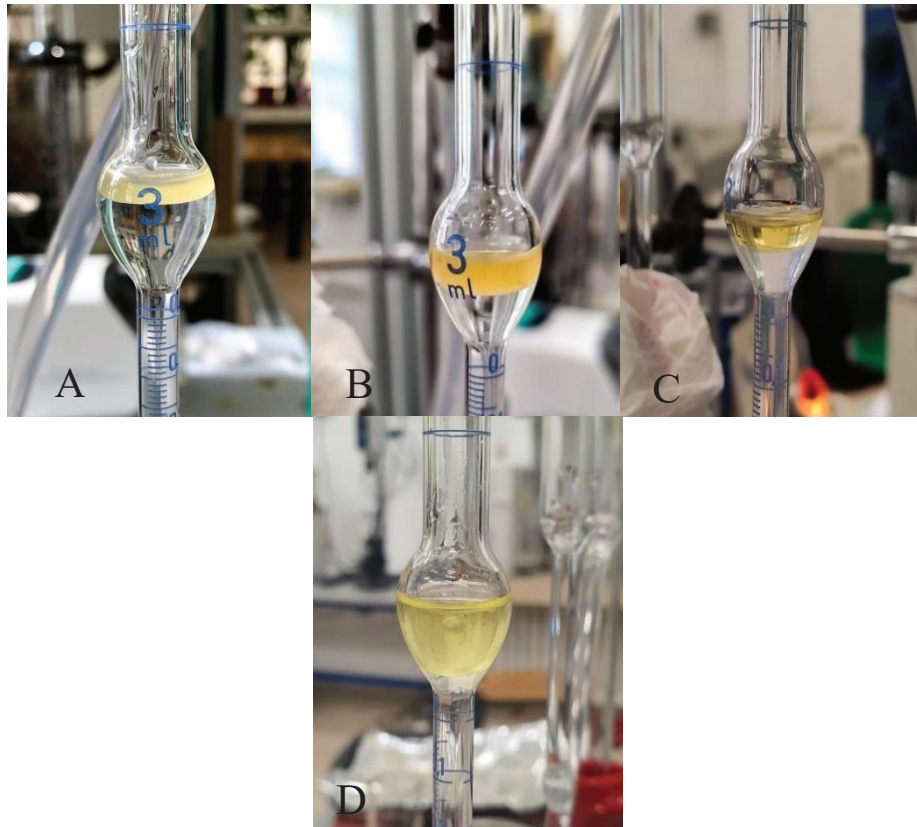
Vrsta biljnog materijala	Udio vlage	Metoda predobrade	Masa uzorka, g	Masa suhe tvari, g	Vrijeme destilacije, h	Prinos eteričnog ulja (mL/100 g suhe tvari)
lat. <i>Zingiber officinale</i>	76,86 %	Svježi	100	23,32	4	1,72
		Sušen na zraku 24 h	56,73	13,23	4	3,90
		Osušeni	38,36	8,95	4	2,79
		Svježi	200 g	46,28	4	2,59
lat. <i>Curcuma longa</i>	79,91 %	Svježi	100	20,09	3	5,97
		Sušena na zraku 24 h	56,73	11,40	3	15,79
		Osušeni	38,36	7,71	3	15,56

Tablica 3. prikazuje detaljne informacije o procesu hidrodestilacije i karakteristikama uzoraka kurkume i đumbira. Eterično ulje je ekstrahirano postupkom hidrodestilacije koristeći aparaturu prema Clevengeru, u skladu s metodom preporučenom od strane Europske farmakopeje. Biljni materijal izložen je različitim metodama obrade prije postupka ekstrakcije, čime se direktno utjecalo na prinos eteričnog ulja.

3.1.1.1. *Zingiber officinale*

Iz tablice 3. vidljivo je da najveći prinos eteričnog ulja đumbira dobiven iz uzorka koji je sušen na zraku 24 sata (3,90 ml/100g), zatim suhog đumbira (2,79 ml/100g), a najmanji prinos ima svježi đumbir (1,72 ml/100g). Iz tablice 3. također se može uočiti da isti redosljed vrijedi i za kurkumu, odnosno obrada uzorka rezultirala je jednakim poretkom po veličini prinosa eteričnog ulja. Eterično ulje je prisutno u kanalima u meristematskom dijelu rizoma koji prilikom ribanja biva oštećen te može doći do hlapljenja i gubitka eteričnog ulja. U ovom radu, svi uzorci su usitnjeni na isti način, stoga usitnjavanje ne bi trebalo imati ulogu u promjeni prinosa eteričnog ulja. [69]

S obzirom da su uzorci sušeni na različite načine, ključnu ulogu ima sušenje jer termička obrada može uzrokovati promjene u strukturi biljnog materijala, točnije oštećenja sekretornih struktura koja sadrže eterično ulje. Rezultat toga je povećana dostupnost eteričnog ulja za ekstrakciju što se odražava kroz veći prinos eteričnog ulja. Hasmita i sur. proučavali su utjecaj trajanja hidrodestilacije i sušenja na zraku na prinos eteričnog ulja đumbira te su donijeli zaključak da prinos raste s povećanjem vremena sušenja od 1 do 2 dana, međutim, smanjuje se s daljnjim povećanjem vremena sušenja, što je u skladu sa našim rezultatima.[70] Huang i sur. dokazali su da sušenje đumbira na temperaturi nižoj od 70 °C povećava prinos ulja od đumbira. [71] Ghasemzadeh i sur. su također pratili prinos eteričnog ulja. Najveća količina eteričnog ulja dobivena je iz uzoraka sušenih na zraku. S druge strane, povećanjem temperature sušenja od 34 °C do 150 °C, količina eteričnog ulja značajno je opala zbog razgradnje i isparavanja eteričnog ulja. U našem slučaju, povećanje temperature na 100 °C odnosno primjena infracrvenog sušenja rezultirala je smanjenjem prinosa eteričnog ulja. [72]



Slika 27. Prinos eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom **A)** suhog đumbira, **B)** sušenog 24 h na zraku i **C, D)** svježeg đumbira

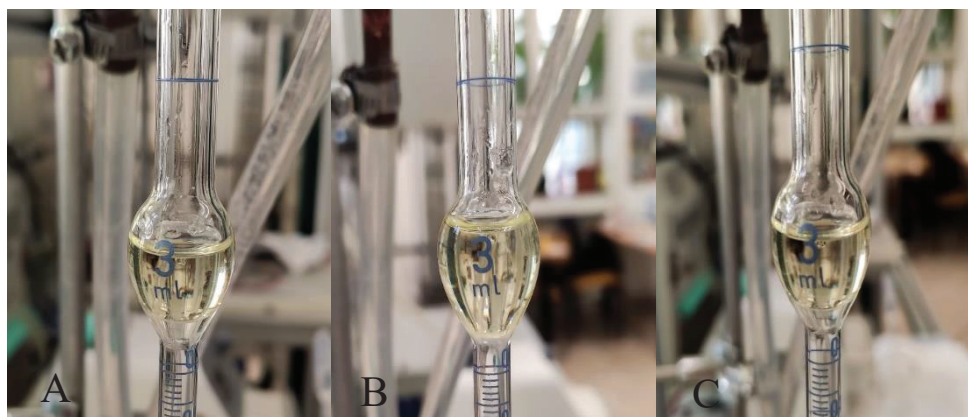
Pored varijacija u prinosu eteričnog ulja đumbira, primjećuju se i promjene boje i prozirnosti dobivenog ulja prikazanog na slici 27., što ukazuje na različit kemijski sastav. Tijekom procesa sušenja, može doći do degradacije termički nestabilnih spojeva i nastajanja novih spojeva, što zatim rezultira promjenama u boji i kemijskom sastavu eteričnog ulja. Primjerice, gingerol koji je prisutan u svježem đumbiru može se transformirati u šogaol i zingiberen tijekom procesa sušenja. 6-gingerol je jedan od važnijih fenola u eteričnom ulju đumbira te zajedno sa njegovim dehidriranim analogom, 6-šogaolom, pripada đumbirovoj skupini primarnih bioaktivnih spojeva. Šogaol nastaje uklanjanjem hidroksilne skupine na gingerolu, dok zingiberen nastaje uklanjanjem molekule vode iz gingerola pod djelovanjem topline. Huang i sur. su uz prinos eteričnog ulja, pratili transformaciju 6-gingerola u 6-šogaol do 70 °C, u čijem rasponu transformacija nije zamijećena, dok temperatura viša od 70 °C potiče transformaciju 6-gingerola u 6-šogaol. [71] To potvrđuje promjenu kemijskog sastava dobivenih ulja koja se odražava na boju i prozirnost.

Ispitivani đumbir je porijeklom iz Perua te su zabilježeni prinosi u rasponu od 1,72-3,90 ml/100g. Jayasundara i sur. su u istraživanju dobili prinose čija se vrijednost kretala u

rasponu od 1- 3% za vrste uzgajane na Šri Lanki, dok su prinosi dobiveni iz đumbira uzgajanih u Indiji iznosili približno 0,28%. [73] Na temelju navedenih informacija, može se zaključiti da geografsko podrijetlo đumbira može imati značajan utjecaj na prinos eteričnih ulja.

Prikazani podaci ukazuju na to da je vođenje procesa sušenja, uključujući kontrolu temperature i vremena sušenja, ključno za smanjenje gubitka hlapljivih spojeva i povećanje prinosa eteričnog ulja đumbira. Osim toga, geografsko podrijetlo biljke utječe na prinos eteričnih ulja, što je potvrđeno razlikama u prinosisima biljaka uzgojenih u različitim geografskim regijama.

3.1.1.2. *Curcuma longa*



Slika 28. A) Prinos eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom svježe kurkume, B) kurkume sušene 24 h na zraku i C) suhe kurkume

Rizom kurkume kojima je slijedila različita termička obrada proizveli su blijedo žuto eterično ulje. Prinos eteričnog ulja kurkume prikazan na slici 28., mijenjao se promjenom postupka obrade iz čega se zaključuje da različiti tretmani predobrade imaju značajan utjecaj na prinos eteričnog ulja, kao i kod đumbira. Iz podataka prikazanih u tablici 3., najveći prinos je dobiven hidrodestilacijom kurkume sušene na zraku (15,79mL/100g), potom suhom kurkumom (15,56 mL/100g), a najmanji prinos dobiven je iz svježe kurkume (5,97 mL/100g). Povećanje prinosa kao posljedica sušenja zabilježena je kod nekoliko biljaka, primjerice lat. *Mentha Longifolia*, *Thymus daenensis subsp. daenensis*, *Celak* i lat. *Salvia officinalis L.* [74,75,76]. Rezultati navedenih istraživanja objašnjavaju se činjenicom da visoke temperature uzrokuju promjenu sekretornih struktura biljaka, čime se povećava propusnost ulja iz žlijezda. [77]

Kurkuma na kojoj je provedeno istraživanje je također uvezena iz Perua, a vrijednosti prinosa eteričnog ulja kreću se u rasponu od 5,97-15,79 mL/100g. Mc Gaw i sur. su u svom istraživanju provođenjem hidrodestilacije dobili prinos eteričnog ulja svježe kurkume uvezene iz Trinidada u vrijednosti od 6,1 mL/100 g. [78] Ova vrijednost se poklapa s dobivenim rezultatima prinosa za svježu kurkumu (5,97mL/100g). Analiza eteričnog ulja kurkume koja je uzgojena u Indiji, provedena od strane Ray i sur., pokazala je prinos eteričnog ulja u rasponu od 0,35 do 1,7 ml/100g [77]. Na temelju navedenih podataka, zaključuje se da geografsko podrijetlo utječe značajno na prinos eteričnog ulja.

. Prikazani podaci ukazuju na to da je vođenje procesa sušenja, uključujući kontrolu temperature i vremena sušenja, ključno za smanjenje gubitka hlapljivih spojeva i povećanje prinosa eteričnog ulja kurkume. Osim toga, geografsko podrijetlo biljke utječe na prinos eteričnih ulja, što je potvrđeno razlikama u prinosima biljaka uzgojenih u različitim geografskim regijama.

3.2. KEMIJSKI SASTAV

Kvalitativna karakterizacija dobivenih ekstrakata đumbira i kurkume izvedena je pomoću tankoslojne kromatografije (TLC), plinske kromatografije sa masenom spektroskopijom (GC/MS), infracrvene spektroskopije sa Fourierovom transformacijom (FTIR) i UV/Vis spektroskopije.

3.2.1. Tankoslojna kromatografija (TLC)

3.2.1.1. *Zingiber officinale*

Upotrebom tankoslojne kromatografije, istražena je prisutnost rezorcinola, citrala, gingerola i šogaola u dobivenim ekstraktima đumbira i kurkume. Na slici 29. prikazani su ispitivani đumbirovi ekstrakti:

- Macerat svježeg đumbira u *n*-heksanu - 1
- Ekstrakt svježeg đumbira u *n*-heksanu dobiven Soxhlet ekstrakcijom - 2
- Ekstrakt svježeg đumbira u *n*-heksanu na 25° C pomoću magnetske miješalice- 3

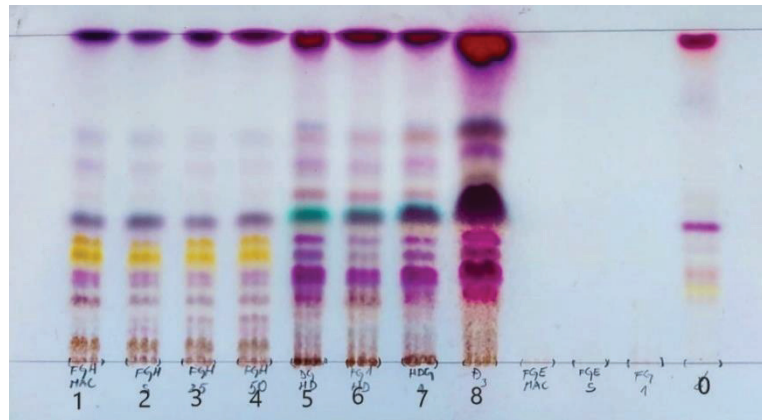
- Ekstrakt svježeg đumbira u *n*-heksanu na 50° C pomoću magnetske miješalice - 4
- Eterično ulje suhog đumbira - 5
- Eterično ulje svježeg đumbira - 6
- Eterično ulje đumbira sušenog na zraku 24 h - 7
- Eterično ulje svježeg đumbira uz 500 ml destilirane vode - 8
- Macerat svježeg đumbira u etanolu – nema rezultata
- Ekstrakt svježeg đumbira u etanolu dobiven Soxhlet ekstrakcijom- nema rezultata
- Ekstrakt svježeg đumbira u etanolu na 25°C potpomognut ultrazvukom - nema rezultata



Slika 29. Ispitivani ekstrakti đumbira

Kromatogram dobiven u skladu s uputama Europske farmakopeje, s referentnom otopinom pokazuje intenzivnu crvenu zonu koja predstavlja rezorcinol u donjoj polovici i dvije ljubičaste zone koje predstavljaju citral u gornjoj polovici. Kromatogram dobiven testnom otopinom pokazuje ispod zone rezorcinola dvije intenzivne ljubičaste zone, odnosno gingerole, i u sredini, između zona rezorcinola i citrala, dvije druge manje intenzivne ljubičaste zone, odnosno šogaole. Mogu biti prisutne i druge zone. Na slici 30. prikazan je kromatogram sa uzorcima ekstrakata đumbira i usporedbenom otopinom. Uočljiva je crvena zona u donjoj polovici kromatograma u većini uzoraka, osim u tri uzorka koja nisu pokazala prisutnost ispitivanih spojeva. Također, na kromatogramu su vidljive dvije ljubičaste zone u gornjoj polovici, što označava prisutnost citrala. Uz navedeno, dokazana je prisutnost šogaola u uzorcima 5.-8., dok se za ostale ne može sa sigurnošću odrediti jer je prisutno preklapanje

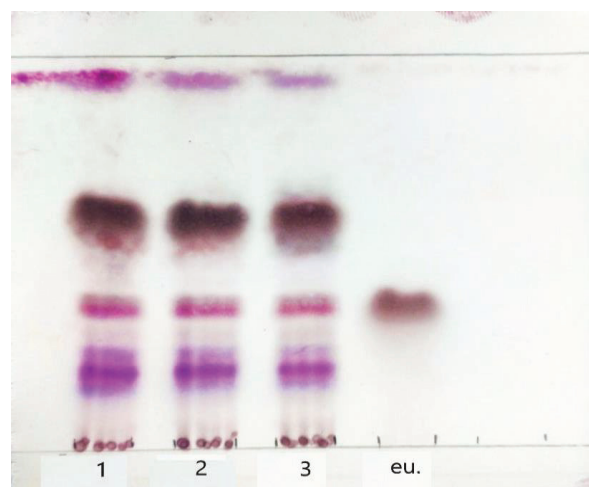
drugih zona. Važno je napomenuti da broj 8 predstavlja eterično ulja svježeg đumbira, s tim da je korištena veća masa đumbira i manji volumen destilirane vode. Općenito, povećanje mase đumbira i smanjenje volumena korištene vode može rezultirati povećanom koncentracijom eteričnog ulja u ekstraktu đumbira. To objašnjava jači intenzitet boja kod dobivenih zona.



Slika 30. TLC analiza uzoraka *Zingiber officinale*

3.2.1.2. *Curcuma longa*

Slika 31. prikazuje kromatogram kojim je potvrđena prisutnost eukaliptola tj. 1,8-cineola u eteričnim uljima dobivenim hidrodestilacijom kurkume sušene na zraku (1) , svježih kurkume (2) i suhe kurkume (3). Crveno-smeđa obojena zona potvrđuje prisustvo 1,8-cineola u svim analiziranim uzorcima, a intenzitet obojenja upućuje na približno jednaku koncentraciju u svim uzorcima.



Slika 31. TLC analiza uzoraka *Curcuma longa*

3.2.2. Plinska kromatografija s masenom spektroskopijom (GC/MS)

3.2.2.1. *Zingiber officinale*

U ovom istraživanju provedena je analiza ekstrakata đumbira i kurkume pomoću plinske kromatografije spojene s masenom spektrometrijom. Rezultati ove analize pružaju detaljan uvid u kemijski sastav i kvantifikaciju ključnih spojeva prisutnih u ekstraktima.

U ekstraktima đumbira identificirano je ukupno 16 spojeva koje čine 72,154 - 86,192% svih ispitivanih ekstrakata. Dobiven kemijski sastav ekstrakata i njihov postotak prikazan je u tablici 4. α -zingiberen se nalazi u najvećem postotku (13,601-34,329%) u svim ispitivanim ekstraktima. Ostale ključne komponente koje dominiraju u ekstraktima su β -felandren (3,819-12,551%), β -bisabolen (6,047-11,621%), β -seskvifelandren (5,076-9,786%), geranial (2,044-17,813%), neral (1,39-7,269%) i kamfen (1,654-9,709%).

Prema dobivenim rezultatima, najveća koncentracija α -zingiberena zabilježena je u heksanskom ekstraktu koji je dobiven korištenjem magnetske miješalice na sobnoj temperaturi. Ostali heksanski ekstrakti također su pokazali visoku koncentraciju α -zingiberena. Na temelju tih rezultata može se zaključiti da je α -zingiberen bolje topljiv u heksanu nego u etanolu i vodi. Budući da nema dostupnih eksperimentalnih istraživanja, nije moguće sa sigurnošću potvrditi tu tvrdnju. Također, važan bioaktivni spoj zingeron je identificiran u dva uzorka: heksanskom ekstraktu dobivenom korištenjem magnetske miješalice pri 25 °C i pri 50 °C. Iz rezultata se može zaključiti da je gingerol bio prisutan u navedena dva uzorka budući da kuhanje ili sušenje đumbira dovodi do transformacije gingerola u zingeron putem retro-aldolne reakcije. [79]

Analizirani ekstrakti sadrže hlapljive spojeve koji se svrstavaju u sljedeće skupine: seskviterpene (41,939-64,312%), monoterpene (2,635-15,188%), monoterpenske okside (9,394-31,665) te ketone (0,546-1,219%) i fenole (3,026-7,865). Seskviterpeni su u svim analiziranim ekstraktima zastupljeni u najvećoj mjeri, a najviše ih ima u heksanovom maceratu (64,312%), slijedi heksanov ekstrakt uz miješalicu pri 25 °C (64,237%) i heksanov ekstrakt uz miješalicu pri 50 °C (59,336%). Zaključuje se da ekstrakciji seskviterpena pogoduje *n*-heksan kao otapalo.

Tablica 4. Kemijski sastav uzorka *Zingiber officinale*

Sastavnica	Hidrodestilacija		Sušen 24 h		Osušeni		Heksan		Maceracija		Soxhlet	Etanol	
	Svježi				25 °C	50 °C			UZV		Skupina tvari		
Citronelol	0,706		0,657	1,607	0,668	0,774	1,055	1,339	3,041		Monoterpeni oksidi		
Undekanon	0,734		0,637	1,219	0,546	0,647	0,802	0,667	1,213		Keton		
Mircen	1,079		1,579	1,279	0,333	0,361	0,479	0,394	0,903		Monoterpeni ugljikovodici		
Germakren D	1,463		0,979	1,53	1,361	1,44	1,576	1,12	1,682		Seskviterpeni ugljikovodici		
Borneol	1,883		1,877	1,767	1,428	2,133	1,566	2,511	1,401		Monoterpeni oksidi		
α-pinen	2,769		3,9	2,595	0,657	0,718	0,696	0,581	1,924		Monoterpeni ugljikovodici		
1,8-cineol	2,891		4,358	2,586	1,634	2,661	1,978	2,733	1,781		Monoterpeni oksidi		
Kurkumen	5,051		3,685	5,113	3,321	3,206	3,771	2,61	7,17		Seskviterpeni ugljikovodici		
Neral	6,507		5,394	1,39	3,558	4,813	3,785	7,269	3,577		Monoterpeni oksidi		
Kamfen	6,566		9,709	6,488	1,645	1,827	2,039	1,794	4,112		Monoterpeni ugljikovodici		
β-seskvifelandren	7,13		5,076	6,62	9,786	8,949	9,484	7,111	7,655		Seskviterpeni ugljikovodici		
β-bisabolen	8,839		6,047	8,338	11,621	10,73	11,521	8,549	10,86		Seskviterpeni ugljikovodici		
Geranial	9,026		7,93	2,044	8,757	12,92	6,942	17,813	4,858		Monoterpeni oksidi		
β-felandren	10,532		12,551	11,098	3,819	4,049	5,55	4,7	7,865		Seskviterpeni ugljikovodici		
α-zingiberen	18,518		13,601	18,48	34,329	30,96	32,41	25,009	17,66		Seskviterpeni ugljikovodici		
Zingeron					7,865	3,026					Fenol		
Ostali spojevi	16,306		22,02	27,846	16,537	13,81	16,346	15,8	24,3				

Monoterpeni su najzastupljeniji u eteričnom ulju đumbira sušenog na zraku (15,188 %), potom u eteričnom ulju svježeg đumbira (10,414%) te eteričnom ulju suhog đumbira (10,363%). Iz navedenih rezultata može se zaključiti da metoda hidrodestilacije omogućuje najučinkovitiji ekstrakciju monoterpena, dok monoterpenski oksidi dominiraju u heksanskom ekstraktu koji je dobiven pomoću Soxhlet uređaja.

Varijacije u prinosu eteričnog ulja mogu se pripisati geografskim uvjetima, ali istovremeno, geografsko porijeklo ima presudan utjecaj na raznolikost kemijskog sastava biljke. Literaturni podaci koji potvrđuju navedenu tvrdnju nalaze se u priloženoj tablici 5. Osim lokacije i okolišnih uvjeta, kemijski sastav eteričnih ulja đumbira također ovisi i o vrsti, svježini ili sušenju te metodama ekstrakcije.

Tablica 5. Literaturni rezultati za kemijski sastav uzoraka eteričnog ulja *Zingiber officinale*

Sastavnica				
Kamfen	3.8- 15.8%	4,9-7,6%	0,068	0,025
Geranial	6,7- 13,9%	7,4-12%	0,308	0,012
β-zingiberen	0- 14.2%	10,5-16,6%	0,171	<0,1%
β-seskvifelandren	2.3-12.2%	5,8-7,2%	0,059	/
β-felandren	12.4 -15.6%	3,4-4,2%	/	/
β-bisabolen	/	/	0,031	0,041
Literaturni podaci	Jayasundara i sur. [73]	Kumar i sur. [66]	Meliani i sur. [80]	Stoyanova i sur. [81]
Porijeklo	Šri Lanka	Indija	Alžir	Vijetnam
Metoda obrade	Sušen na zraku	Sušen na zraku	Svježi	Suhi

3.2.2.2. *Curcuma longa*

Analizom uzoraka eteričnih ulja dobivenih hidrodestilacijom identificirano je ukupno 8 spojeva koji čine 79,050-84,312% svih sastojaka ulja. Detalji su prikazani u priloženoj tablici 6.

Tablica 6. Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja *Curcuma longa*

Sastavnica	Sušena na zraku 24 h	Osušena	Svježa	Klasa organskih spojeva	Vrijeme zadržavanja
α-felandren	2,174%	2,143%	2,383%	seskviterpen	7.757
1,8-cineol	1,328%	1,160%	1,322%	monoterpenski oksid	8.674
Kurkumen	0,639%	0,729%	1,076%	diketon	27.150
Zingiberen	0,761%	0,805%	1,741%	seskviterpeni	27.656
β- seskvifelandren	0,650%	0,656%	1,294%	seskviterpeni	28.762
Turmeron-ar	26,299%	27,980%	23,551%	seskviterpeni	34.272
Turmeron	33,319%	27,813%	34,361%	seskviterpeni	34.417
Kurlon	19,142%	17,764%	18,401%	seskviterpeni	35.518

Spojevi koji čine najveći udio eteričnog ulja su turmeron (55,793-59,618%), kurlon (17,764-19,142%) i α -felandren (2,143-2,383%). Prethodna istraživanja Raya i sur. također su pokazala slične rezultate te potvrđuju pouzdanost dobivenih rezultata.[77] Najvažnije bioaktivne komponente u hlapljivom ulju su ar-turmeron, α -turmeron i β -turmeron. Udio turmerona je najviši u eteričnom ulju sušenom na zraku (59,618%), zatim u ulju svježe kurkume (57,912%), a najmanji je u ulju suhe kurkume (55,793%). α -turmeron i β -turmeron su najzastupljeniji u svježoj kurkumi (34,361%), a najmanje zastupljeni u suhoj kurkumi (27,813%), dok za udio ar-turmerona vrijedi suprotno. Razlog tome može biti oksidacija nestabilnog α -turmerona i β -turmerona u stabilni ar-turmeron. [82] Razgradnjom α -turmerona i β -turmerona došlo je do porasta udjela ar-turmerona u suhoj kurkumi (27,980%) i kurkumi sušenoj na zraku (26,299%) u odnosu na svježu kurkumu (23,551%). Iz toga se zaključuje da navedenoj reakciji stabilizacije turmerona pogoduju visoke temperature što rezultira povećanim udjelom ar-turmerona.

Seskviterpeni su klasa organskih spojeva koja čini najveći udio eteričnog ulja (77,161-82,345%), a najviše su zastupljeni u kurkumi sušenoj na zraku (82,345%), zatim svježoj kurkumi (81,731%), dok najniži udio seskviterpena ima suha kurkuma (77,161%). U znatno

manjoj mjeri su zastupljeni monoterpenski oksidi (1,160-1,328%), čiji redoslijed smanjivanja udjela je jednak redoslijedu smanjivanja seskviterpena. U uzorcima su još identificirani diketoni kojih je najviše u uzorku svježije kurkume (1,076%), zatim u suhoj kurkumi (0,729%) i najmanje u kurkumi sušenoj na zraku (0,639%).

Tablica 7. Literaturni rezultati za kemijski sastav uzoraka eteričnog ulja *Curcuma longa*

Zemlja porijekla	Literaturni podaci	Glavne komponente ulja
Nigerija	Oyemitan i sur. [83]	Turmeron (35.9%), β -turmeron (12.9%), ar-turmeron (10.0%), α -felandren (15.5%)
Koreja	Hwang i sur. [84]	α -zingiberen (27-36%) ar-turmeron (19-32%), β -seskvifelandren (13-18%), α -turmeron (3- 6.5%), β -turmeron (2 – 5%)
Bangladeš	Chowdhury i sur. [85]	Ar-turmeron (27.78%), turmeron (17.16%), kurlon (13.82%), 2-karen (4.78%), zingiberen (4.37%) and β -seskvifelandren (5.57%).

Primijećeno je da je došlo do smanjenja koncentracije kemijskih spojeva u eteričnom ulju *C. longa*, pri čemu je stupanj smanjenja ovisio o primijenjenom postupku sušenja. Iako razlike u kemijskom sastavu nisu znatno različite, sušenjem na zraku se ostvaruje najbolje očuvanje hlapljivih spojeva i najučinkovitija ekstrakcija. Razlike u kemijskom sastavu kurkume različite obrade rezultat su oksidacije, hidrolize, esterifikacije velike količine spojeva i brojnih drugih procesa. U prilog tome idu literaturni podaci koji pokazuju da općenito postoji velika varijacija u kemijskom sastavu hlapljivog ulja dobivenog različitim metodama sušenja iste začinske biljke ili aromatične biljke. Te varijacije obično su kvantitativne prirode, ali mogu biti i kvalitativne.[86]

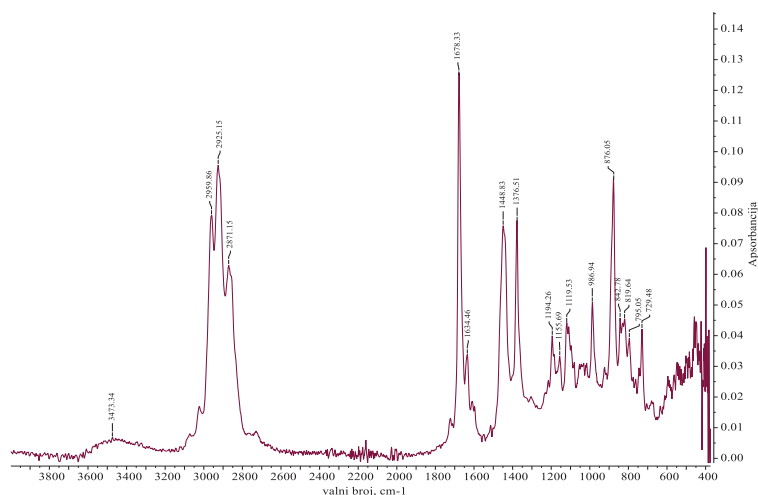
Ispitivana kurkuma je uvezena iz Perua, a opće poznato je da sastav eteričnog ulja kurkume, ali i drugih biljaka varira ovisno o lokaciji. Ova tvrdnja potvrđena literaturnim podacima prikazanim u tablici 7.

3.2.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

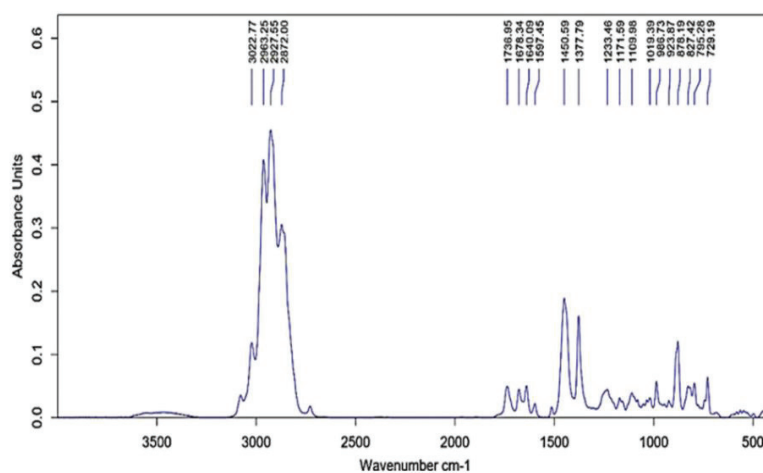
3.2.3.1. *Zingiber officinale*

FTIR spektroskopija je učinkovit analitički alat za detekciju funkcionalnih skupina i karakterizaciju kovalentnih veza u biološkim sustavima. FTIR spektri eteričnih ulja su složeni, što je rezultat preklapanja spektara pojedinačnih komponenti i kombinacije različitih vibracija. [87]

Na slici 32. prikazan je spektar eteričnog ulja đumbira dobivenog hidrodestilacijom svježeg đumbira snimljen u rasponu valnih duljina $400\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$, a na slici 34. se nalaze FTIR spektri eteričnog ulja kurkume dobivenog hidrodestilacijom svježe, osušene i kurkume sušene na zraku 24 h snimljeni u rasponu valnih duljina $500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$.



Slika 32. FTIR spektar eteričnog ulja đumbira dobivenog hidrodestilacijom svježeg đumbira

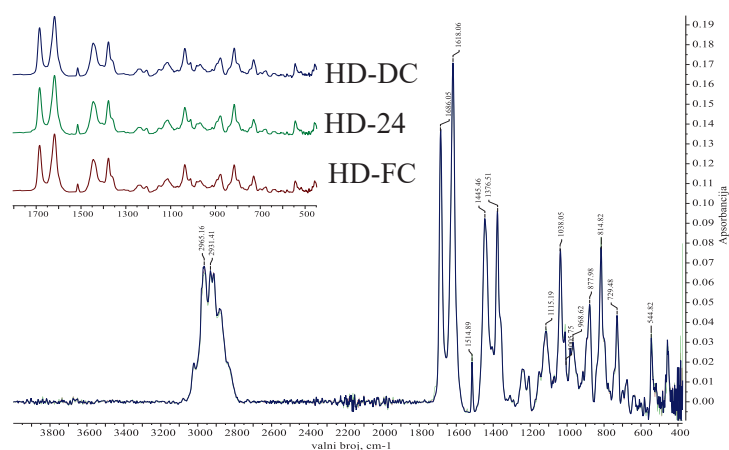


Slika 33. Usporedbeni FTIR spektar eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom svježeg đumbira [88]

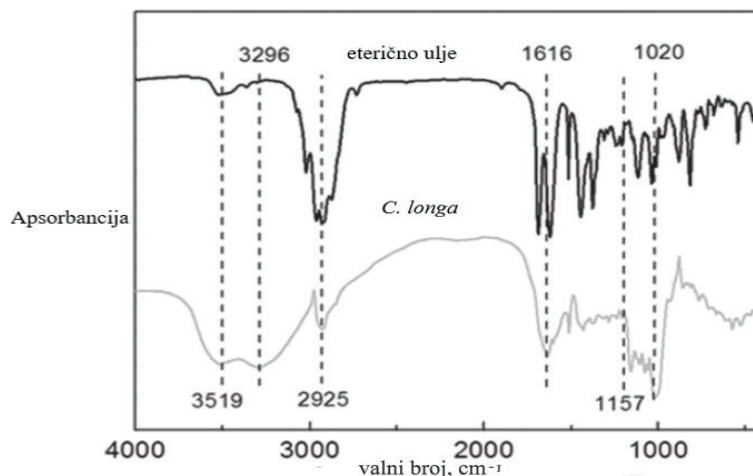
Pik na $3473,3\text{ cm}^{-1}$ predstavlja signal karakterističan za vibraciju istežanja O-H veze, što je svojstveno za molekule vode, alkohole i karboksilne funkcionalne skupine. Osim navedenog pika koji se slaže sa literaturnim FTIR spektrom, u oba slučaja su prisutna 4 intenzivna vrha na vrijednostima od $3090, 2959.86, 2925.15$ i 2871.15 cm^{-1} koji odražavaju vibracije karboksilne funkcionalne skupine ili su povezane sa simetričnim CH_3 , asimetričnim CH_2 i simetričnim CH_2 istežanjem. [88,89] Dva pika na valnim duljinama od 1678.33 i 1634.46 cm^{-1} ukazuju na prisutnost karbonilnih skupina te se također poklapaju sa literaturnim podacima. [88] Pik koji se opaža na 1448.83 cm^{-1} odgovara vibracijama savijanja CH_2 i CH_3 alifatskih skupina. Stoga pikovi na 1376.51 i 1448.83 cm^{-1} mogu predstavljati 1,8-cineol. [88, 89] Uz navedene pikove, prisutni su i pikovi srednjeg intenziteta u na $1376.51, 1194.26, 729.48$ i 876.05 cm^{-1} , čija prisutnost sugerira na istežanje aromatskih prstena, alkene, etere i fenole, a istežanje C-O grupe vidljivo je od $1300-1100\text{ cm}^{-1}$.

3.2.3.2. *Curcuma longa*

Fourierovom transformiranom infracrvenom spektroskopijom analizirano je eterično ulje dobiveno hidrodestilacijom svježe kurkume, sušene na zraku i osušene. Ova tehnika služila je za identifikaciju funkcionalnih skupina prisutnih u ulju. Slika 34. prikazuje usporedbu FTIR spektara u navedena tri slučaja, dok slika 35. prikazuje usporedbu FTIR spektara eteričnog ulja kurkume i praha kurkume.



Slika 34. FTIR spektri eteričnog ulja kurkume dobivenih hidrodestilacijom: HD-FC – svježa kurkuma; HD-24 – kurkuma sušena na zraku 24 h; HD-DC osušena kurkuma



Slika 35. Usporedbeni FTIR spektri eteričnog ulja kurkume i kurkuminog praha [90]

Pikovi na 2965.16 i 2931.41 odgovaraju vibracijama istezanja C-H veza u metil (CH_3) i metilen (CH_2) skupinama. Pikovi na 1445,46 cm^{-1} i 1376.51 odgovaraju asimetričnim i simetričnim vibracijama savijanja CH_2 i CH_3 alifatskih skupina te mogu predstavljati 1,8-cineol jer ima molekularnu strukturu koja uključuje metil i metilen skupine. Na spektralnoj duljini blizu 2200 cm^{-1} , detektirani su suptilni signali koji su rezultat vibracija istezanja aromatske C=C veze. Pik na 1686.05 cm^{-1} sugerira na prisustvo karbonilne skupine (C=O). Pikovi koji se nalaze u rasponu između 1100 i 1300 cm^{-1} obično su rezultat vibracija istezanja C-O veze. Dakle, pojava pikova unutar ove domene implicira prisutnost C-O veze.

FTIR apsorpcijski spektri ispitivanih eteričnih ulja pokazuju očekivane karakteristične pikove C-H istezanja ($\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$), C=O istezanje ($\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$), široko O-H istezanje ($\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$) koje nije vidljivo kod kurkume i C-O istezanje ($\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$) terpenoidnih komponenti prisutnih u eteričnim uljima. [88]

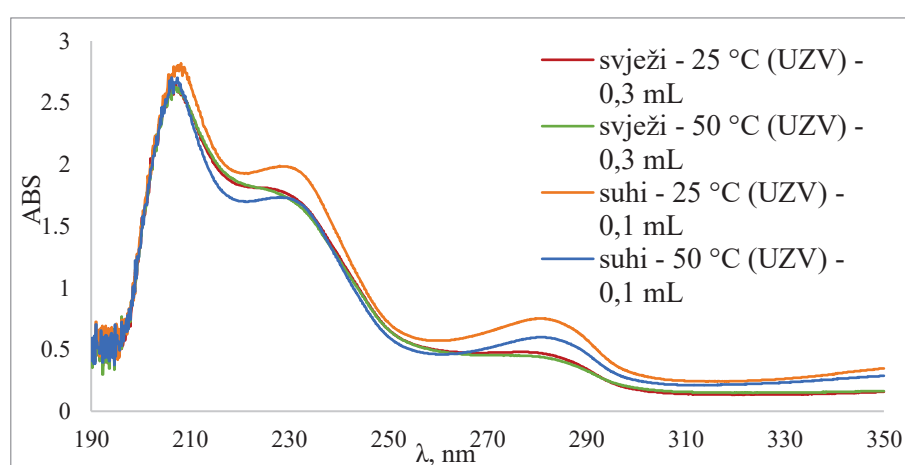
3.2.4. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija je tehnika koja se koristi u kemijskoj analizi za identifikaciju različitih tvari, uključujući i eterična ulja. Aktivni sastojci ovih ulja, kao što su kurkumin u kurkumi i gingerol i šogaol u đumbiru, pokazuju specifične apsorpcijske vrhove na određenim valnim duljinama. Ove karakteristične apsorpcije mogu se koristiti za potvrdu prisutnosti ovih spojeva u uzorcima.

3.2.4.1. *Zingiber officinale*

Gingeroli i šogaoli su aktivni spojevi u đumbiru koji imaju karakteristične apsorpcije u UV/Vis spektru. Literaturni podaci potvrđuju da gingeroli obično pokazuju maksimalne apsorpcijske vrhove oko 225 nm i 280 nm, dok šogaoli također pokazuju apsorpciju na sličnim valnim duljinama. [93] Stoga se pikovi u UV/Vis spektru na navedenim valnim duljinama mogu koristiti za identifikaciju đumbirovog ekstrakta.

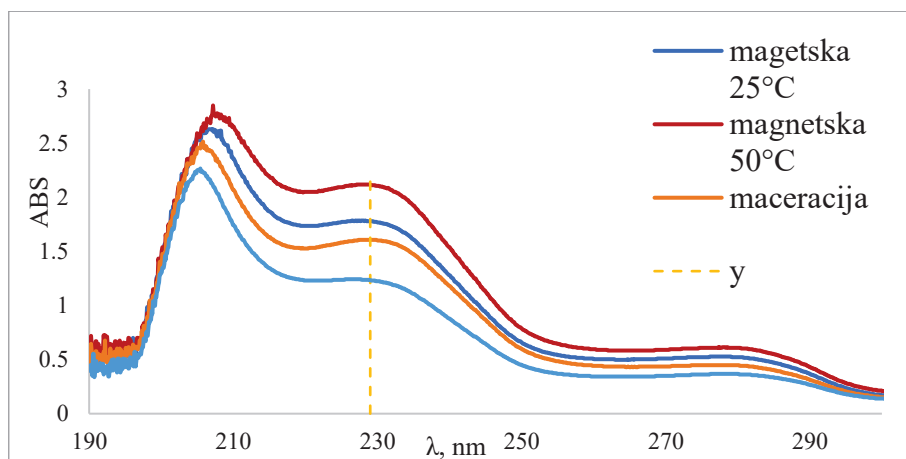
Na slici 35. prikazan je UV/Vis spektar etanolnih ekstrakata dobivenih iz svježeg i osušenog đumbira na 100 °C, uz pomoć ultrazvuka.



Slika 35. UV/Vis spektri etanolnih ekstrakata đumbira dobivenih uz pomoć ultrazvuka

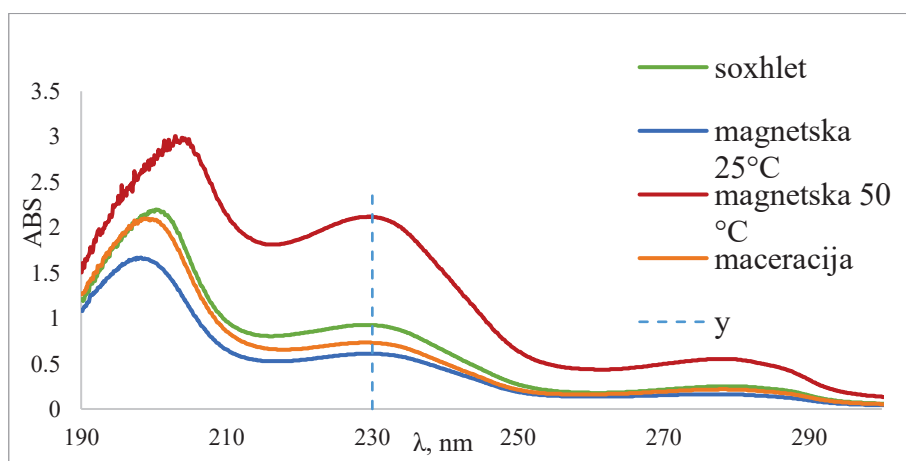
Dva izražena pikova na 230 i 280 nm, karakteristična za gingerole i šogaole, prisutna su u spektru etanolnog ekstrakta đumbira. Ova opažanja potvrđuju identifikaciju ekstrakta kao derivata đumbira. Pojačan intenzitet pikova u ekstraktima sušenog đumbira može biti posljedica procesa sušenja, tijekom kojeg se konverzija gingerola u šogaol počinje događati već na 60 °C. [91] Veći intenzitet spektralnih pikova ukazuje na povećanu efikasnost ekstrakcije šogaola u odnosu na gingerol.

Slika 36. prikazuje UV/Vis spektre različitih etanolnih ekstrakata đumbira. Svaki spektar jasno izražava prepoznatljive pikove specifične za đumbirov ekstrakt. Takva dosljednost u detekciji ovih karakterističnih pikova potvrđuje uspješnu ekstrakciju komponenti đumbira u svim uzorcima.



Slika 36. UV/Vis spektri etanolnih ekstrakata đumbira dobivenih primjenom različitih metoda ekstrakcije

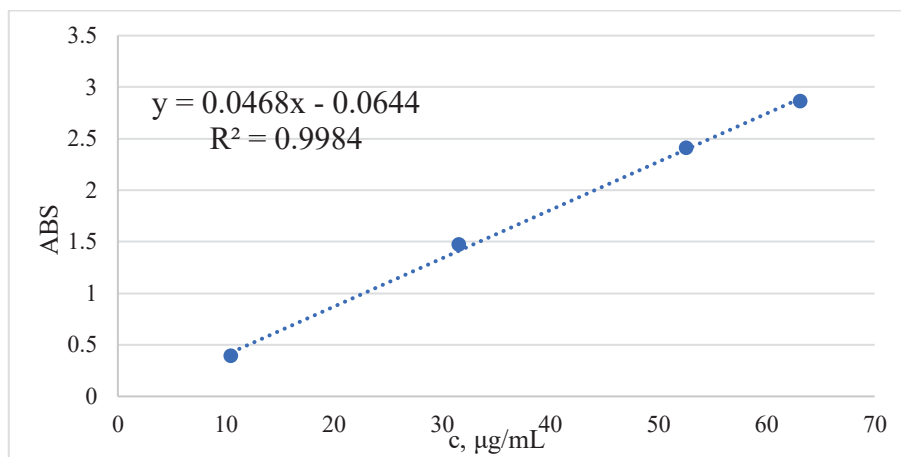
Na slici 37. prikazani su UV/Vis spektri različitih heksanskih ekstrakata đumbira. Prisutni su karakteristični pikovi đumbirovog ekstrakta na valnim duljinama 230 i 280 nm. Među različitim metodama ekstrakcije, postupak ekstrakcije svježeg đumbira uz magnetsku miješalicu na 50 °C rezultirao je najintenzivnijim spektralnom krivuljom. Ovaj intenzitet može ukazivati na veću koncentraciju bioaktivnih spojeva u ekstraktu u odnosu na Soxhlet ekstrakciju, magnetsku ekstrakciju na 25°C i maceraciju.



Slika 37. UV/Vis spektri heksanskih ekstrakata đumbira dobivenih primjenom različitih metoda ekstrakcije

Baždarni pravac, prikazan na slici 38., u ovom slučaju je dobiven mjerenjem apsorbancije UV/Vis svjetla standardnih otopina đumbirovog eteričnog ulja u heksanu s poznatim koncentracijama. Izrađeni baždarni pravac za eterično ulje đumbira se može koristiti

u kvantitativnoj analizi jer omogućava određivanje koncentracije određenih komponenti (npr. gingerola ili šogaola) u uzorcima ulja đumbira. Spektri standardnih otopina snimani su u rasponu od 190-290 nm te se može pretpostaviti da su se spektralni pikovi za gingerole i šogaole nalazili unutar tog raspona.



Slika 38. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije gingerola i šogaola u heksanu putem UV/Vis spektroskopije

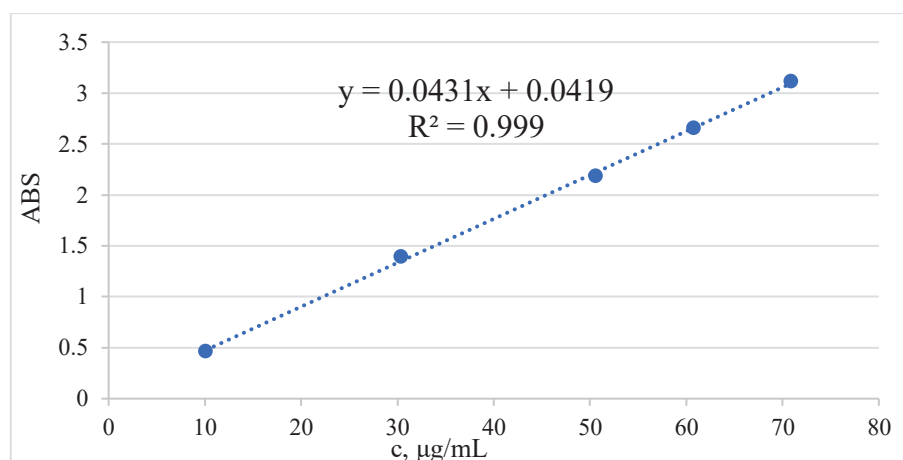
Uvrštavanjem vrijednosti apsorbancije u jednadžbu baždarnog pravca, moguće je odrediti koncentraciju gingerola i šogaola u uzorcima te su prikazane u tablici 10.

Tablica 10. Koncentracija standardnih otopina, odgovarajuće apsorbancije i izračunate koncentracije gingerola i šogaola

c(e.u.), µg/mL	ABS	c(Σg.+š.), µg/mL
10,53	0,392	9,75
31,59	1,471	32,81
52,65	2,451	53,75
63,18	2,848	62,23
73,71	3,188	69,50

Provedena je i UV/Vis spektroskopija na eteričnom ulju đumbira otopljenom u etanolu, od kojeg su potom pripremljene standardne otopine različitih koncentracija. Kao rezultat

dobiven je baždarni dijagram prikazan na slici 39. i koncentracija gingerola i šogaola prikazana u tablici 11.



Slika 39. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije gingerola i šogaola u etanolu putem UV/Vis spektroskopije

Tablica 11. Koncentracija standardnih otopina, odgovarajuće apsorbancije i izračunate koncentracije gingerola i šogaola

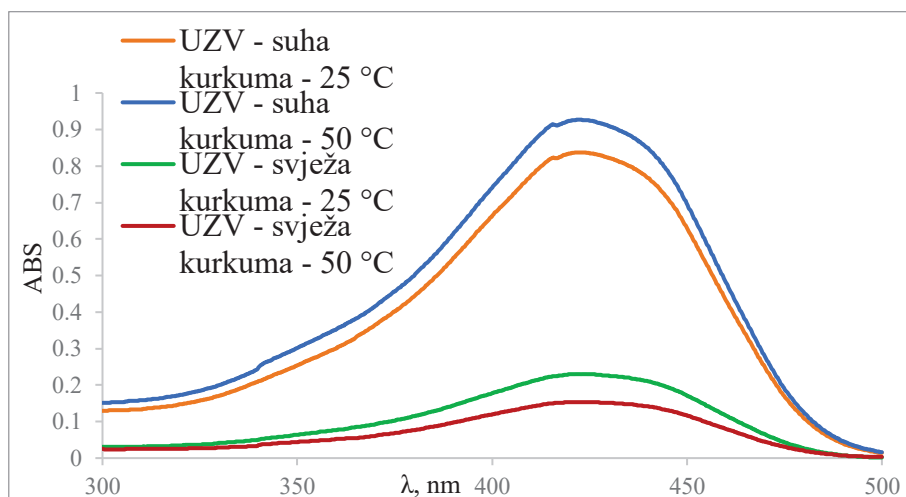
c(e.u.), µg/mL	ABS	c(Σg.+š.), µg/mL
10,13	0,463	9,77
30,39	1,395	31,34
50,65	2,181	49,56
60,78	2,657	60,67
70,91	3,111	71,14

3.2.4.2. *Curcuma longa*

UV/Vis spektroskopija koristila se za identifikaciju kurkuminih ekstrakata dobivenih različitim metodama ekstrakcije. Kurkumin, glavni sastojak kurkume, ima maksimalni apsorpcijski vrh (λ_{\max}) oko 425 nm u etanolu, te je stoga provedeno snimanje u rasponu valnih duljina od 300-500 nm. Različite metode ekstrakcije mogu rezultirati različitim količinama ekstrahiranog kurkumina, a time i različitim intenzitetima apsorpcijskih pikova na UV/Vis

spektru. Stoga, usporedbom UV/Vis spektara moguće je dobiti uvid u učinkovitost pojedinih metoda u ekstrakciji kurkumina iz kurkume.

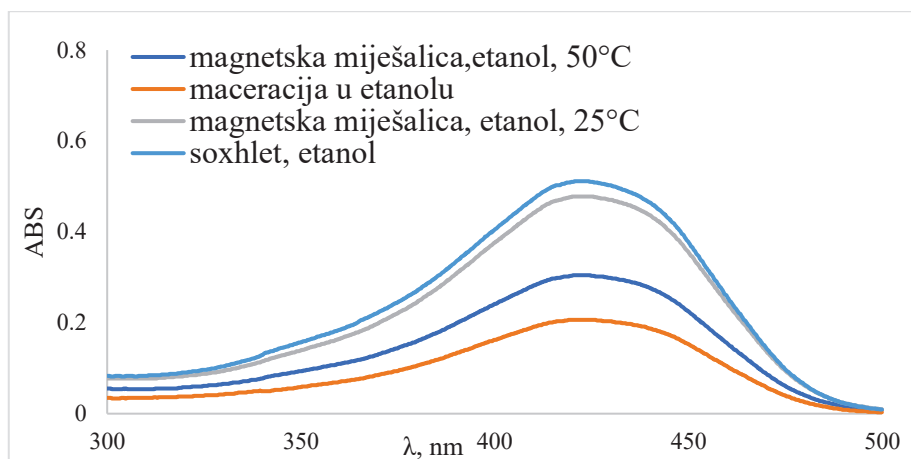
Slika 40. prikazuje karakteristički široki pik na 425 nm u ekstraktima svježe i suhe kurkume pri 25 i 50 °C.



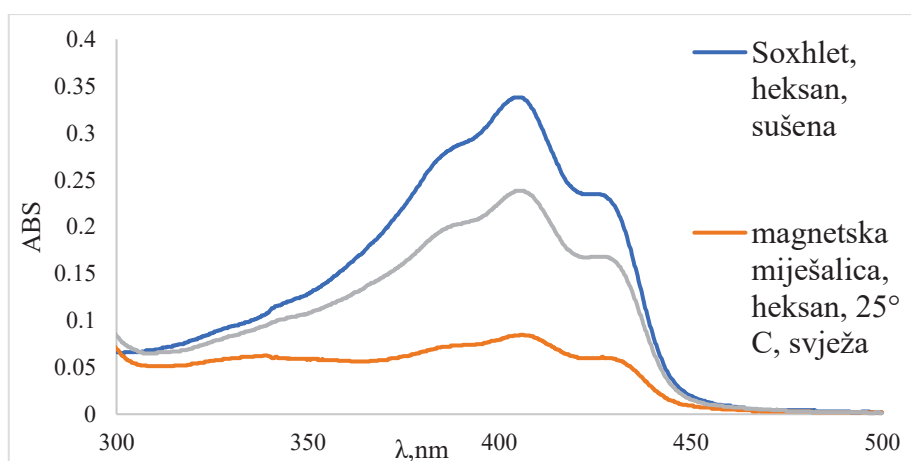
Slika 40. UV/Vis spektri etanolnih ekstrakata kurkume dobivenih uz pomoć ultrazvuka

Ovaj pik sugerira na prisutnost kurkumina, no da bi se sa sigurnošću mogla potvrditi prisutnost, potrebno je provesti dodatnu analizu. Primjećuje se znatno intenzivniji pik kod ekstrakata suhe kurkume, što može biti posljedica veće koncentracije kurkumina.

Na slici 41. i 42. prikazani su UV/Vis spektri etanolnih i heksanskih ekstrakata kurkume dobivenih različitim metodama ekstrakcije. Karakteristični široki pik na 425 nm vidljiv na svim spektrima sugerira prisutnost kurkuminog ekstrakta. Međutim, zapaža se da se kod heksanskih ekstrakata karakteristični pik pojavljuje na 405 nm, što ukazuje na mogućnost pomaka spektra prema kraćim valnim duljinama. Ova promjena može biti posljedica interakcije kurkumina s heksanom, što utječe na elektronsku strukturu i stoga mijenja spektralne karakteristike kurkumina.



Slika 41. UV/Vis etanolni ekstrakti svježe kurkume dobiveni različitim metodama ekstrakcije



Slika 42. UV/Vis spektri heksanskih ekstrakata kurkume dobivenih različitim metodama ekstrakcije

3.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

Disk difuzijski test je često korištena metoda za ispitivanje antimikrobne aktivnosti tvari, uključujući eterična ulja. Postupak je relativno jednostavan i jeftin, što ga čini idealnim za preliminarna ispitivanja.

Ekstrakti kurkume dobiveni hidrodestilacijom kurkume sušene na zraku te svježe i suhe kurkume podvrgnuti su ispitivanju antimikrobne aktivnosti, usredotočujući se na potencijalnu inhibiciju rasta odabranih mikroorganizama. Bakterijske vrste na kojima su ispitivani uzorci uključivale su *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*, te kvasac *Candida lipolytica*.

3.3.1. *Zingiber officinale*

Ekstrakti đumbira podvrgnuti su ispitivanju antimikrobne aktivnosti na prethodno navedenim mikroorganizmima. Rezultati su prikazani u tablici 12.

Tablica 12. Promjeri zona inhibicija ekstrakata *Zingiber officinale* za ispitivane mikroorganizme, 1- maceracija u heksanu, 2- hidrodestilacija suhog đumbira, 3- hidrodestilacija svježeg đumbira, 4- hidrodestilacija svježeg đumbira, 5- hidrodestilacija đumbira sušenog na zraku, 6- Soxhlet ekstrakcija svježeg đumbira u heksanu, 7- ekstrakcija svježeg đumbira uz magnetsko miješanje na 25 °C.

Uzorak	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.lipolytica</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
1	nema inhibicije	11 mm	nema inhibicije	8 mm	nema inhibicije	nema inhibicije
2	nema inhibicije	25mm	nema inhibicije	10 mm	nema inhibicije	nema inhibicije
3	nema inhibicije	8 mm	nema inhibicije	21 mm	nema inhibicije	nema inhibicije
4	9 mm	24 mm	nema inhibicije	14 mm	nema inhibicije	9 mm
6	11 mm	26 mm	nema inhibicije	23 mm	nema inhibicije	nema inhibicije
7	/	10 mm	/	/	/	/
8	/	12 mm	/	nema inhibicije	/	/

Đumbir ne pokazuje antibakterijsko djelovanje na *P. aeruginosa*, *E. faecalis* i *S. aureus*, osim u slučaju koncentriranijeg eteričnog ulja svježeg đumbira dobivenog hidrodestilacijom (9 mm). Uzorci đumbira su pokazali dobra antifungalna svojstva za *C.lipolyticu*, s iznimkom heksanskog ekstrakta dobivenog pomoću magnetske miješalice na sobnoj temperaturi. Najbolje antifungalno djelovanje prema kvascu *C. lipolytica* pokazalo je ulje đumbira sušenog na zraku sa zonom inhibicije od 23 mm, dok je ulje svježeg đumbira prikazalo neznatno nižu učinkovitost, s zonom inhibicije od 21 mm. Antifungalno djelovanje đumbira potvrđeno je i na

drugim vrstama poput *T. rubrum* (72 mm), *M. gypseum* (69 mm), *A. niger* (14 mm) i *A. fumigatus* (15 mm). [92,93]

Ekstrakti đumbira pokazali su inhibitorni učinak prema *B. subtilis*, a ulje đumbira sušenog na zraku je pokazalo najveću zonu inhibicije od 26 mm, zatim slijedi ulje suhog đumbira sa zonom inhibicije od 25 mm te ulje svježeg đumbira sa zonom od 24 mm. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima Meliani i sur. u čijem radu je đumbirov ekstrakt također imao inhibitorni učinak na *B. subtilis* (13 mm). Mnoga istraživanja potvrđuju da umjereno antimikrobno djelovanje proizlazi iz monoterpenskih oksida, seskviterpena, fenolnih spojeva, konkretno gingerola i šogaola. [80]

3.3.2. *Curcuma longa*

Tablica 13. Promjeri zona inhibicija eteričnih ulja *Curcuma longa* za ispitivane mikroorganizme

Uzorak	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
HD FC svježa	10 mm	10 mm	9 mm	9 mm	9 mm	10 mm
HD DC osušena	9 mm	12 mm	9 mm	44 mm	8 mm	10 mm
HD 24 sušena na zraku	9 mm	15 mm	9 mm	9 mm	12 mm	9 mm
prosjeck	9,33	12,33	9,00	20,67	9,67	9,67

Rezultati difuzijskog testa svih eteričnih ulja prikazani su u tablici 13. Antimikrobnim ispitivanjem disk difuzijskom metodom dokazana je osjetljivost svih ispitivanih mikroorganizama na eterična ulja kurkume. Goncalves i sur. te Kamazeri i sur. su dobili slične rezultate za *E.coli* i *P.aeruginosa*. [94,95] To je važan rezultat jer određene bakterije iz navedene grupe, primjerice *P. aeruginosa*, karakterizira multirezistencija što otežava liječenje.

Prema rezultatima, ekstrakt suhe kurkume dobiven hidroddestilacijom (HD DC) pokazao je ujedno i najveću stopostotnu antimikrobnu aktivnost na *C. lipolytica* sa zonom inhibicije od 44 mm, dok je zona inhibicija ostalih ekstrakata iznosila 9 mm, što je čak 5x puta manja antimikrobna aktivnost. Provedena su istraživanja antimikrobne aktivnosti na gljivicama *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* i *Aspergillus flavus* te je potvrđeno antifungalno djelovanje kurkuminog ulja na određenim koncentracijama. [96,97] Inhibitorni učinak u navedenim literaturama objašnjava se sinergističkim djelovanjem manjih komponenata prisutnih u eteričnom ulja, ali je mehanizam nepoznat.

Eterično ulje kurkume sušene na zraku (HD 24) pokazalo je malo povećanje antimikrobne aktivnosti u odnosu na ulje svježije kurkume te je najveća zona inhibicije od 15 mm dobivena za *B. subtilis*. Iz navedenih rezultata, može se zaključiti da je postignuta neznatno veća zona inhibicije kod gram-pozitivnih bakterija u odnosu na gram-negativne. Različit stupanj osjetljivosti ekstrakata kurkume na bakterijske sojeve mogao bi biti posljedica razlika u strukturi stanične stijenke gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Chouhan i sur. u svom istraživanju pojašnjavaju da gram-negativne bakterije poput *E. coli* i *P. aeruginosa* imaju čvrstu lipopolisaharidnu vanjsku membranu, što ograničava difuziju hidrofobnih spojeva kroz nju. [98] Osim toga, Kwiatkowski i sur. spominju da gram-pozitivne bakterije mogu olakšati infiltraciju hidrofobnih spojeva eteričnih ulja zbog lipofilnih krajeva lipoteihonske kiseline prisutne u staničnoj membrani. Ovi spojevi imaju ključne procese u stanici zbog povećane propusnosti membrane, što posljedično dovodi do izlaska iona i važnih staničnih sastojaka, što na kraju vodi do smrti stanica. [99]

4. ZAKLJUČAK

Rizomi biljaka *Zingiber officinale* i *Curcuma longa* ekstrahirana su raznim metodama ekstrakcije te je provedena karakterizacija dobivenih uzoraka. Eksperimentima je potvrđeno da se sušenjem na zraku ostvaruje najveći prinos eteričnog ulja đumbira i kurkume, odnosno najučinkovitija ekstrakcija. Kontrola parametara sušenja, poput temperature i trajanje procesa, pokazala se ključnom komponentom za optimizaciju ekstrakcije kurkume i đumbira.

Kemijski sastav eteričnih ulja određivao se pomoću tankoslojne kromatografije, plinske kromatografije s masenom spektrometrijom, infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom i UV/Vis spektrofotometrije. Potvrđeno je da seskviterpeni čine većinu organskih spojeva prisutnih u ekstraktima đumbira i kurkume. Seskviterpenski oksid α -zingiberen prisutan je u najvećim količinama u ekstraktima đumbira, dok seskviterpenski turmeroni čine većinu kemijskog sastava eteričnog ulja kurkume. Zaključeno je da sastav eteričnih ulja varira ovisno o metodi ekstrakcije, načinu sušenja i vrsti ekstrakcijskog otapala.

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti dokazana je osjetljivost svih ispitivanih mikroorganizama na eterično ulje kurkume, dok su ekstrakti đumbira pokazali znatno manju osjetljivost, sa najvećim inhibitornim učinkom prema *B. subtilis* i *C. lipolytici*.

LITERATURA

- [1] K. Poljanec, Proizvodnja biljnih ekstrakata, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017.
- [2] A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro, J.J.C. Scheffer, Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 23 (2008) 213-226.
- [3] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446–475.
- [4] H.S. Elshafie, I.Camele, An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *Biomed Res Int.* 2017 (2017) 1-14.
- [5] D. Kosir, Ekstrakcija eteričnog ulja i koncentrata iz smilja, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.
- [6] R.P.W. Scott, *Encyclopedia of Analytical Science*, Vol. 2, Elsevier, 2005, str. 554-561
- [7] URL: <https://www.intechopen.com/chapters/62573> (pristup 29.7.2023.)
- [8] R.N. Alolga, F. Wang, X. Zhang, J. Li, L.P. Tran, X. Yin, Bioactive Compounds from the Zingiberaceae Family with Known Antioxidant Activities for Possible Therapeutic Uses, *Antioxidants* 7 (2022) 1281.
- [9] URL: <https://www.heb.com/product-detail/fresh-ginger-root/448930> (pristup 29.7.2023.)
- [10] Khodaie L, Sadeghpour O. Ginger from ancient times to the new outlook. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 17 (2015) 18402.
- [11] URL: <https://www.intechopen.com/chapters/84599> (pristup 29.6.2023.)
- [12] P. A. Vasala, *Handbook of Herbs and Spices*, Vol. 2, Woodhead Publishing, 2012, str. 319-335.
- [13] Y. Shukla, M. Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food. Chem. Toxicol.* 45 (2007) 683–90.
- [14] S.M. Zick, Z. Djuric, M.T. Ruffin, A.J. Litzinger, D.P. Normolle, M.R. Feng, Pharmacokinetics of 6-, 8-, 10-gingerols and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 (2008) 1930–1936.

- [15] G.D. Stoner, Ginger: Is it ready for prime time? *Cancer Prev. Res.* 6 (2013) 257–262.
- [16] A.T. Mbavebg, V. Kuete, *Medicinal spices and vegetables from Africa*, Academic Press. Dschang, Kamerun, 2017, str. 627-363.
- [17] J. Feng, Z. Du, L. Zhang, W. Luo, Y. Zheng, D. Chen, Chemical composition and skin protective effects of essential oil obtained from ginger (*Zingiber officinale roscoe*), *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 21 (2018) 1542-1549.
- [18] P.K. Sharma, V. Singh, M. Ali, Chemical composition and antimicrobial activity of fresh rhizome essential oil of *Zingiber officinale roscoe*, *Pharmacogn. J.* 8 (2018) 185-190.
- [19] A. Kim, L. Min, Y. Lee, Ginger on Human Health: A Comprehensive Systematic Review of 109 Randomized Controlled Trials, *Nutrients* 12 (2022) 157.
- [20] H. Bliddal, A. Rosetzky, P. Schlichting, A randomized, placebo-controlled, cross-over study of ginger extracts and ibuprofen in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 8 (2000) 9-12.
- [21] A. Yusuf, B. Lawal, A. N. Abubakar, E. Berinyuy, Y. O Omonije, S. I Umar M. N, Shebe, Y. C. Alhaji, In-vitro antioxidants, antimicrobial and toxicological evaluation of Nigerian *Zingiber officinale*. *Clinical Phytosci.* 8 (2018) 4–12.
- [22] G. Singh, I. P. S. Fapoor, P. Shigh, C. S. Heluani, M. P. Lampasona, C. A. N. Catalan, Chemistry, Antioxidant and Antimicrobial Investigations on Essential Oil and Oleoresins of *Zingiber Officinale*. *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 3295–3302.
- [23] G. S. El-Baroty, H. H. A. El-Baky, R. S. Farag, M. A. Saleh, Characterization of Antioxidant and Antimicrobial Compounds of Cinnamon and Ginger Essential Oils. *Afr. J. Biochem. Res.* 6 (2010) 167–174.
- [24] V. K. Bajpai, S. M. AL-Reza, U. K. Choi, J. H. Lee Kang, Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Leaf Essential Oil and Extracts of *Metasequoia Glyptostroboides* Miki Ex HU. *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 1876–1883.
- [25] S. Zhang, Q. Liu, Y. Liu, and H. Qiao, Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, induced apoptosis of pancreatic carcinoma cells through p53 signaling pathway, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 8 (2012) 936030

- [26] K. Ishiguro, T. Ando, O. Maeda, Ginger ingredients reduce viability of gastric cancer cells via distinct mechanisms, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 (2007), 218–223.
- [27] Ç.Yücel, G.Ş. Karatoprak, Ö.B. Açıkara, Immunomodulatory and anti-inflammatory therapeutic potential of gingerols and their nanoformulations., *Front Pharmacol.* 13 (2022) 902551.
- [28] A. Karabašić, A. Dervišević, J. Lukić, R. Zelenović i M. Šljivić Husejnović, Upotreba đumbira u medicinskom tretmanu, *Hrana u zdravlju i bolesti.* 5 (2016) 562-566
- [29] S. Dugasani, M.R. Pichika, V.D. Nadarajah, M.K. Balijepalli, S. Tandra, J.N. Korlakunta, Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J Ethnopharmacol.* 127 (2010) 515–20.
- [30] N. Vivoda, Kurkumin u kliničkim istraživanjima, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2017.
- [31] [URL: https://www.medicalnewstoday.com/articles/318405](https://www.medicalnewstoday.com/articles/318405) (pristup 29.7.2023.)
- [32] K.Das, Turmeric (*Curcuma longa*) Oils, *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 2016, str. 835–841.
- [33] I. Chattopadhyay, K. Ranajit. Turmeric and Curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Curr Sci.* 87 (2003) 10.
- [34] B. B.Aggarwal, W. Yuan, S. Li, S. C.Gupta, Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric, *Mol. Nutr. Food. Res.* 57 (2013) 1529–1542.
- [34] J.Sambhav, R. Rohit, U.Ankit Raj, M.Garima, *Curcuma longa* in the management of inflammatory diseases: a review. *Int. Ayur. Med. J.* 2 (2017) 33–40.
- [35] M. Fan Cheng, Z. Dai, R. Ting, L. JinJian, L. ChunMing, *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*, Academic Press, 2018, str. 299-350.
- [36] J. Bačić Katinić, *Fitopreparati s kurkumom u ljekarničkoj praksi, Završni specijalistički*, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2019.
- [37] S.G. Jaiswal, S.N. Naik, Turmeric Oil: Composition, Extraction, Potential Health Benefits and Other Useful Applications, *Avicenna J. Med. Biochem.* 9 (2021) 93-106

- [38] S. Li, Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops*. 5 (2011) 28-54.
- [39] J.Sharifi-Rad, Y. E.Rayess, A. A.Rizk, C.Sadaka, R.Zgheib, W. Zam, Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications. *Sec. Ethnopharmacology* 11 (2020) 52-62
- [40] B.Salehi, E.Capanoglu, N.Adrar, G. Catalkaya, , S. Shaheen, M. Jaffer, Cucurbits plants: A key emphasis to its pharmacological potential. *Molecules* 24 (2019) 1854.
- [41] V. P. Menon, A. R.Sudheer, Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin, *Adv. Exp. Med. Biol.* 595 (2007) 105-25.
- [42] Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods*, 6 (2017) 92.
- [43] D. Yance, S. M. Sagar, Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr. Cancer Ther.* 5 (2006) 9–29.
- [44] J. Ye, Y.Zhang, Curcumin protects against intracellular amyloid toxicity in rat primary neurons. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 5 (2012) 44–49
- [45] P.Plianbangchang, T.Watcharaphorn, , T.Waree, Efficacy and safety of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles facial cream as an anti-aging agent. *Int. J Pharm.* 15 (2007) 73–81.
- [46] URL: <https://www.prnewswire.com/news-releases/curcumin-market-size-worth-1-30-billion-by-2025-cagr-12-3-grand-view-research-inc--811278562.html> (pristup 30.7.2023.)
- [47] Lj. Žilić, Hlapljivi spojevi smilja:završni rad, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2019.
- [48] A. E.Asbahani, K.Miladi, W. Badri, M.Sala, E. H. A Addi, H.Casabianca, A. Elaissari, Essential oils: From extraction to encapsulation, *Int. J. Pharm.* 483 (2015) 220–243.
- [49] E.Ibáñez, J. A.Mendiola, M.Castro-Puyana, Supercritical Fluid Extraction, *RSC Green Chemistry* 8 (2013) 196-230.

- [50] D. Vasiljević, Eterična ulja zimzelenog bilja otoka Brača, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2021.
- [51] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibañez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review, *Food Chemistry*, 98 (2006) 136-148.
- [52] Assami, Karim, Pingret Kipman, Daniella, Chemat, Smain, Meklati, Brahim, Chemat, Farid, Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 62 (2012) 99–105.
- [53] M. Vinatoru, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (2001) 303–313.
- [54] H. Kataoka, *Pharmaceutical Analysis: Sample Preparation*, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering.
- [55] URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/escherichia-coli> (pristup 10.7.2023.)
- [56] L. Hadžić, B. Šeol Martinec, S. Pintarić, Beta-laktamaze proširenog spektra bakterije *Escherichia coli*, *Hrvatski veterinarski vjesnik*, 29 (2021) 28-36.
- [57] URL: <https://www.fitness.com.hr/zdravlje/ozljede-bolesti/Escherichia-coli-e-coli.aspx> (pristup 28.6.2023.)
- [58] URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.gpp3-0053-2018> (pristup 28.6.2023.)
- [59] URL: <https://sciencephotogallery.com/featured/2-enterococcus-faecalis-bacteria-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html?product=art-print> (pristup 28.6.2023.)
- [60] URL: <https://www.palinternational.com/en/healthcare/knowledge-hub/infections-a-to-z/staphylococcus-aureus/> (pristup 28.6.2023.)
- [61] URL: https://bs.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus (pristup 28.6.2023.)
- [62] B. Čelić, Krivulje rasta bakterija *Bacillus subtilis* i *Acinetobacter baumannii* u ovisnosti o temperature, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2022.

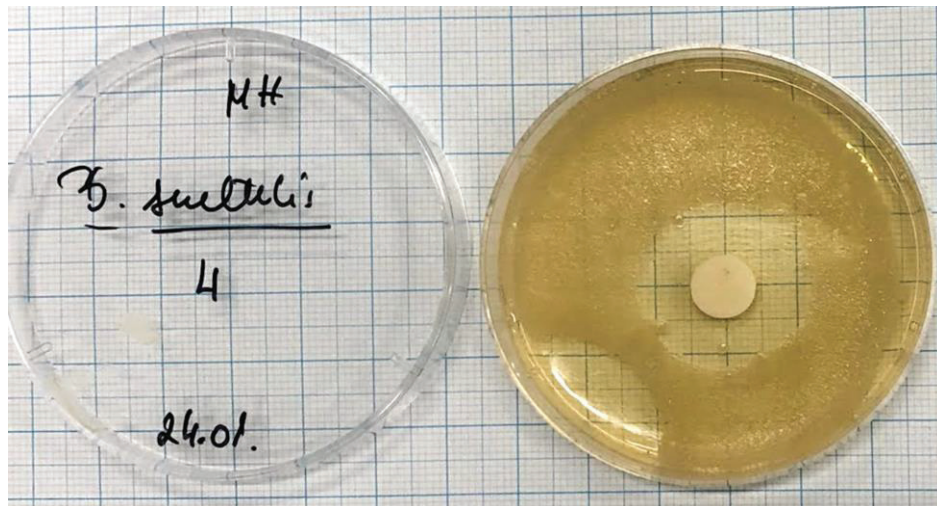
- [63] URL: <https://microbz.co.uk/bacillus-subtilis/> (pristup 28.6.2023.)
- [64] M. Gužvinec, I. Butić, S. Bukovski, S. Luci, A. Tambi Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, *Infektološki glasnik* 32 (2012) 71–80.
- [65] URL: <https://www.biomerieux-industry.com/pt/farma-cuidados-de-saude/recursos/microrganismos-farmaceuticos/2020-05-17-how-does-pseudomonas> (pristup 28.6.2023.)
- [66] M. Kumar, et al., Role of *Candida albicans* infection in oral cancer: A mini review. *Oral Oncol.* 73 (2022) 181-184.
- [67] O. Simonetti, V. Zerbato, S. Sincovich, L. Cosimi, F. Zorat, V. Costantino, M. Di Santolo, M. Buseti, S. Di Bella, L. Principe, R. Luzzati, *Candida lipolytica* Bloodstream Infection in an Adult Patient with COVID-19 and Alcohol Use Disorder: A Unique Case and a Systematic Review of the Literature. *Antibiotics* 12 (2023) 691.
- [68] URL: <https://mycocosm.jgi.doe.gov/YarliW29/YarliW29.home.html> (pristup 30.7.2023)
- [69] P.N. Ravindran, K.N. Babu, *Ginger: The Genus Zingiber*, CRC Press, Boca Raton, 2016, str. 225-227.
- [70] I. Hasmita, M. Muhammad, Effect of Drying and Hydrodistillation Time on the Amount of Ginger Essential Oil. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology.* 5 (2015) 300.
- [71] T.-C. Huang, C.-C. Chung, H.-Y. Wang, C.-L. Law, H.-H. Chen., Formation of 6-Shogaol of Ginger Oil Under Different Drying Conditions. *Drying Technology*, 29 (2011) 1884–1889.
- [72] A. Ghasemzadeh, H. Z. E. Jaafar, A. Baghdadi, A. Tayebi-Meigooni, (Formation of 6-, 8- and 10-Shogaol in Ginger through Application of Different Drying Methods: Altered Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Molecules* 23 (2018), 1646.
- [73] N. Jayasundara, P. Arampath, Effect of variety, location & maturity stage at harvesting, on essential oil chemical composition, and weight yield of *Zingiber officinale* roscoe grown in Sri Lanka, *Heliyon*, 7 (2021) 6560.
- [74] S. Singh, Effect of Drying on the yield and chemical composition of essential oils obtained from *Mentha longifolia* leaves 8 (2020) 67-69.

- [75] R. Sayed, Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymys daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. *Industrial Crops and Products* 42 (2013) 613–619.
- [76] I. H. Sellami, I. B.Rebey, J. Sriti, F. Z.Rahali, F.Limam, B. Marzouk, Drying Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants and Its Effects on Content, Chemical Composition, and Radical Scavenging Activity of the Essential Oil. *Food and Bioprocess Technology* 5 (2011). 2978–2989.
- [77] A. Ray, S. Mohanty, S. Jena i sur., Drying methods affects physicochemical characteristics, essential oil yield and volatile composition of turmeric (*Curcuma longa* L.), *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 26 (2022) 100357.
- [78] D.Mc Gaw, R. Skeene, Comparison of the Sub-Critical Fluid Extraction of the Essential Oil of Turmeric (*Curcuma longa* L.) with That of Hydrodistillation. *Eng*, 2 (2021) 608-619.
- [79] V. A. S.Jesudoss, S. Victor Antony Santiago, K. Venkatachalam, P. Subramanian, Zingerone (Ginger Extract). *Gastrointestinal Tissue*, Academic Press, Cambridge, 2017., 289–297.
- [80] A. Meliani, S. Nair, A.Bensoltane,. Cyto-biochemical and Antimicrobial Investigations on Essential Oil of Zingiber officinaleRoscoe. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17 (2014) 1120–1129.
- [81] A.Stoyanova, A.Konakchiev, S. Damyanova, I. Stoilova, P.T. Suu,. Composition and Antimicrobial Activity of Ginger Essential Oil from Vietnam. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 9 (2013) 93-98.
- [82] G. Singh, I. P. Kapoor, P. Singh, C.S. de Heluani, M.P. de Lampasona, C.A. Catalan. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food Chem Toxicol*. 48 (2010) 1026-1031.
- [83] I. A. Oyemitan, C.A. Elusiyan, A.O. Onifade, M.A. Akanmu, A.O. Oyedeji, A.G. McDonald. Neuropharmacological profile and chemical analysis of fresh rhizome essential oil of *Curcuma longa* (Turmeric) cultivated in southwest Nigeria. *Toxicol Rep*. 4 (2017) 391-8.
- [84] K.W. Hwang, D. Son, H.W. Jo, C.H. Kim, K.C. Seong, J. K. Moon, Levels of curcuminoid and essential oil compositions in turmeric (*Curcuma longa* L.) grown in Korea. *Appl Biol Chem*. 59 (2016) 209-15.

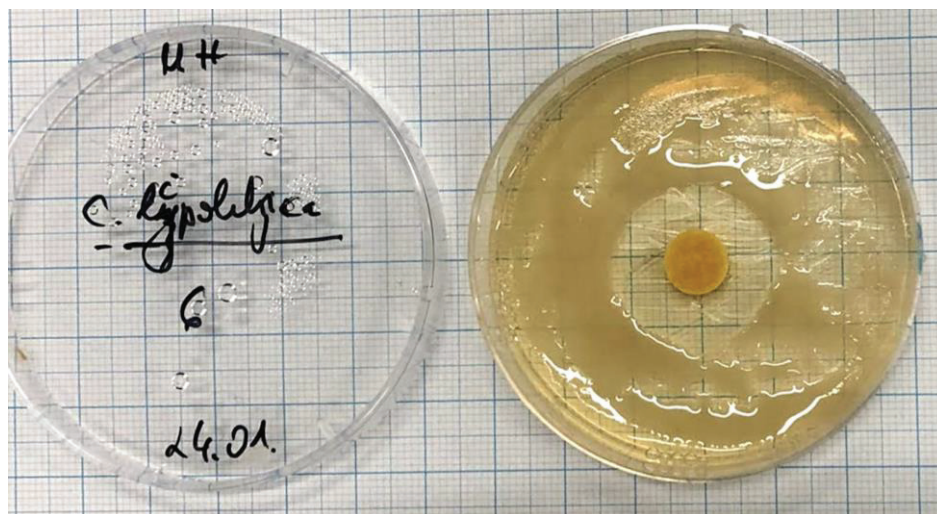
- [85] J.U.Chowdhury, N.C. Nandi, M.N. Bhuiyan, M.H. Mobarok, Essential oil constituents of the rhizomes of two types of *Curcuma longa* of Bangladesh. *Bangladesh J Sci Ind Res.* 43: (2008) 259-66.
- [86] M. C. Díaz-Maroto, E.Sánchez Palomo, L. Castro, M. González Viñas, M. S. Pérez-Coello,. Changes produced in the aroma compounds and structural integrity of basil (*Ocimum basilicum*L) during drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 (2004), 2070–2076.
- [87] S. Agatonovic-Kustrin, P. Ristivojevic, V. Gegechkori, T. M. Litvinova, W. Morton, Essential Oil Quality and Purity Evaluation via FT-IR Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques. *Applied Sciences.* 10 (2020) 7294.
- [88] A. Farshbaf-Sadigh, H. Jafarizadeh-Malmiri, N. Anarjan, Y. .Najian, Preparation of Ginger Oil in Water Nanoemulsion Using Phase Inversion Composition Technique: Effects of Stirring and Water Addition Rates on their Physico-Chemical Properties and Stability. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 235 (2021) 295-314.
- [89] K. Bounaas, N. Bouzidi, Y. Daghbouche, S. Garrigues, M. de la Guardia M., El Hattab,. Essential oil counterfeit identification through middle infrared spectroscopy. *Microchemical Journal*, 139 (2018), 347–356.
- [90] L. A. Araújo, R.G. Araújo, F.O. Gomes i sur., Physicochemical/photophysical characterization and angiogenic properties of *Curcuma longa* essential oil. *An Acad Bras Cienc.* 88 (2016) 1889-1897.
- [91] M. Liu, X. Xia, G.Chou, D.Liu, A.Zuberi, J. Ye, Z. Liu, Variations in the Contents of Gingerols and Chromatographic Fingerprints of Ginger Root Extracts Prepared by Different Preparation Methods. *Journal of AOAC International*, 97 (2014) 50–57.
- [92] M. Sharma, R. Sharma, Synergistic Antifungal Activity of *Curcuma longa* (Turmeric) and *Zingiber officinale* (Ginger) Essential Oils Against Dermatophyte Infections, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14 (2011) 38-47.
- [93] B. Mahendra, Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences.* 3 (2008) 81- 88.

- [94] G. Gonçalves, P. Silva, Gabriela. The essential oil of *Curcuma longa* rhizomes as an antimicrobial and its composition by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Revista de Ciências Médicas*. 28 (2019) 1-10.
- [95] T. S. Kamazeri, O.A. Samah, M. Taher, D. Susanti, H. .Qaralleh, Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. *Asian Pac J Trop Med*. 5 (2012) 202-209.
- [96] G. Singh, O. P. Singh, and S. Maurya, Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 45 (2002) 75–81.
- [97] F. D. Ferreira, C. Kemmelmeier, C. C. Arrotéia, Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link, *Food Chemistry* 46 (2013) 136789–793.
- [98] S. Chouhan, K. Sharma, S. Guleria, Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives *Medicines*, 4 (2017) 58.
- [99]
P. Kwiatkowski, Ł. Łopusiewicz, M. Kostek, E. Drozłowska, A. Pruss, B. Wojciuk, M. Sienki ewicz, H. Zielińska-Bliźniewska, B. Dołęgowska, The antibacterial activity of lavender essential oil alone and in combination with Octenidine Dihydrochloride against MRSA strains, *Molecules* 25 (2020) 95.

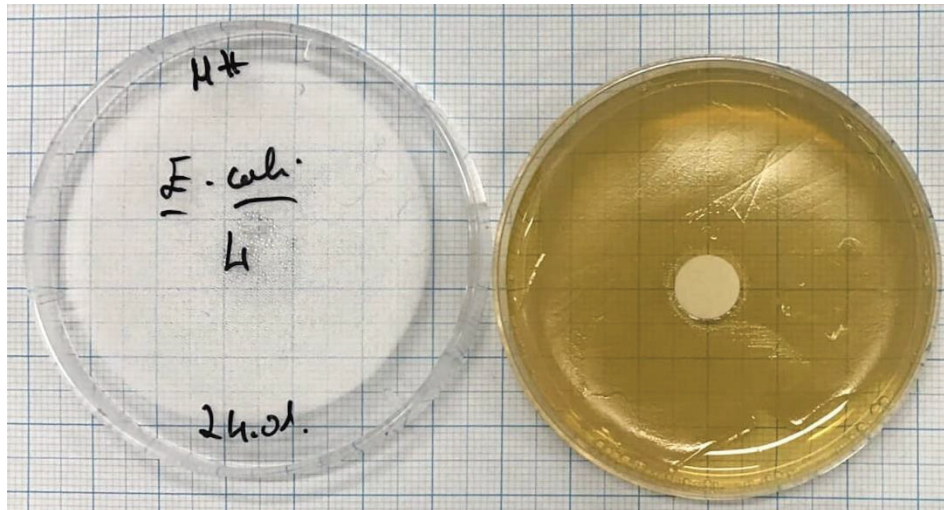
PRILOZI



Slika 43. Utjecaj eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom svježeg đumbira na bakteriju *B.subtilis*



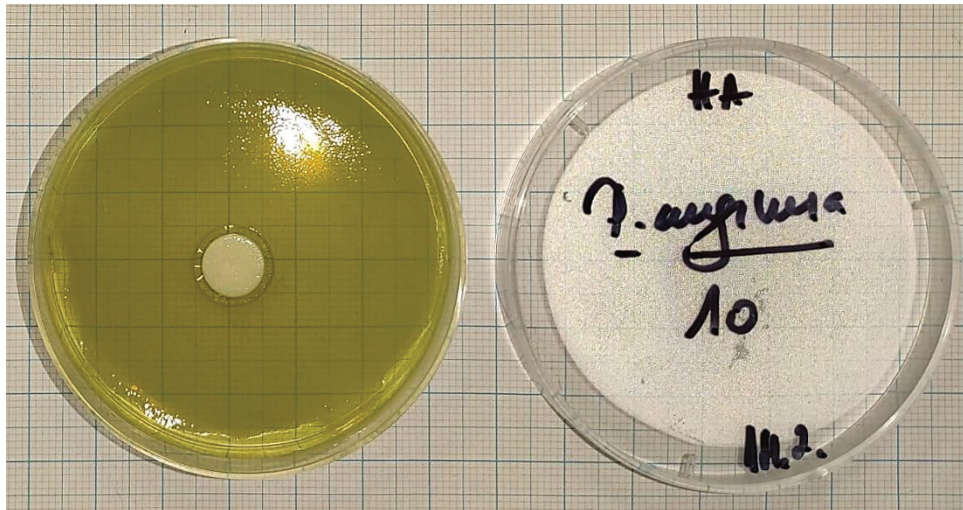
Slika 44. Utjecaj eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom đumbira sušenog 24 h na zraku na kvasac *C.lipolytica*



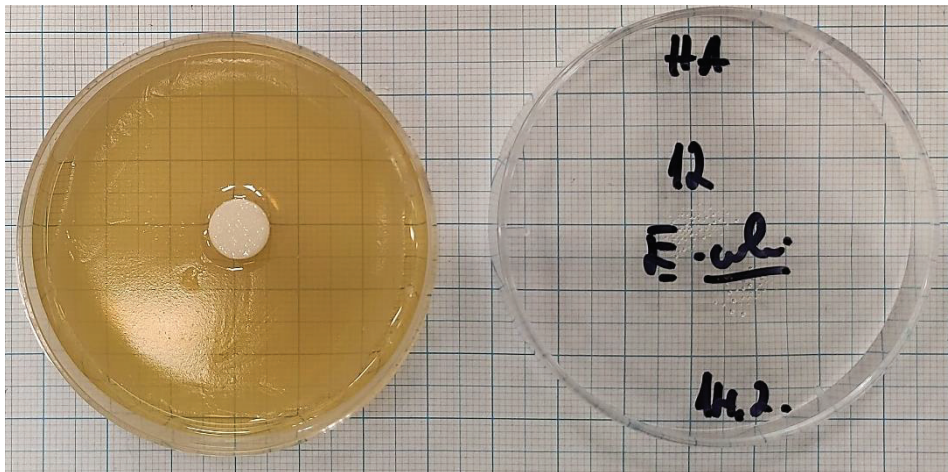
Slika 45. Utjecaj eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom svježeg đumbira na bakteriju *E. coli*



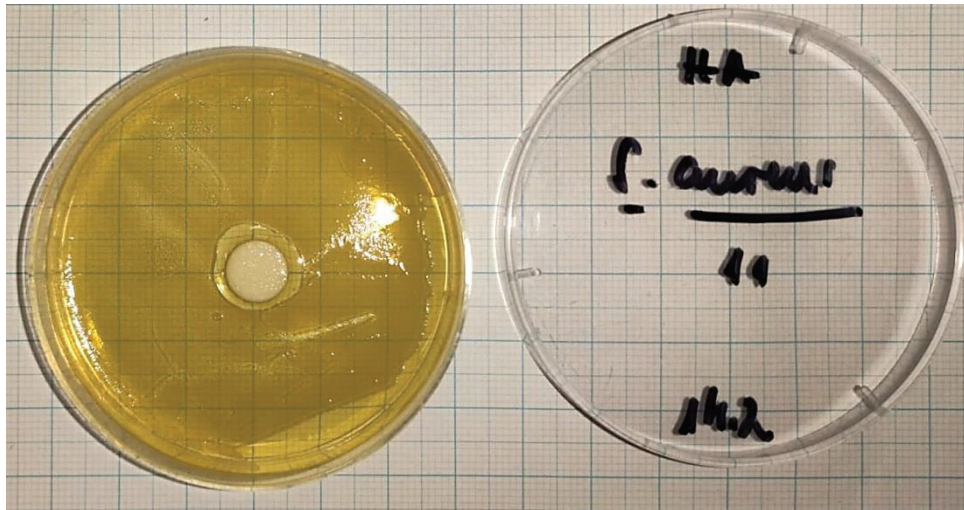
Slika 46. Utjecaj eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom svježeg đumbira na bakteriju *S. aureus*



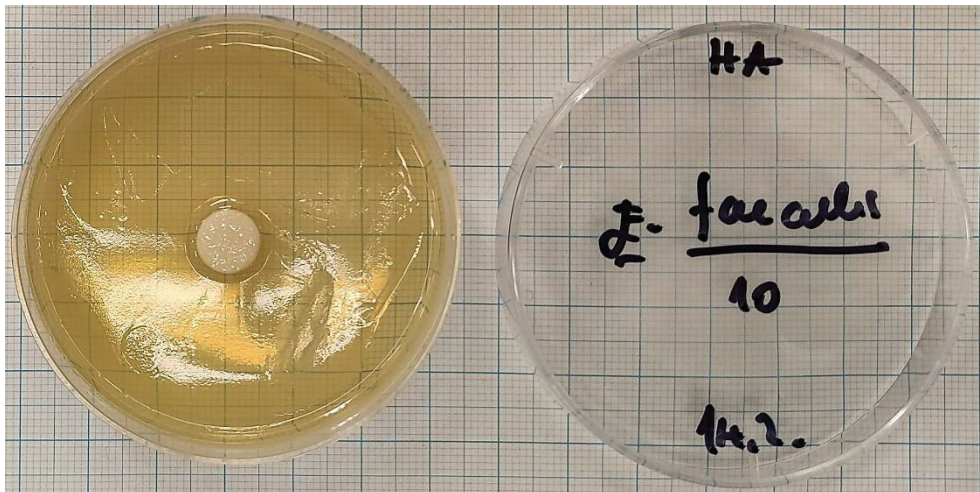
Slika 47. Utjecaj eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom svježe kurkume na bakteriju *P. aeruginosa*



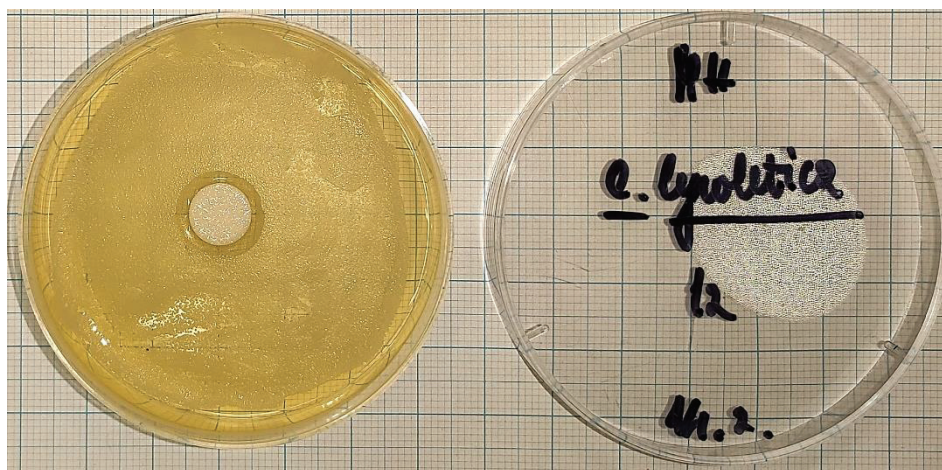
Slika 48. Utjecaj eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom kurkume sušene 24 h na zraku na bakteriju *E. coli*



Slika 49. Utjecaj eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom osušene kurkume na bakteriju *S. aureus*



Slika 50. Utjecaj eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom svježe kurkume na bakteriju *E. faecalis*



Slika 51. Utjecaj eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom kurkume sušene 24 h na zraku na kvasac *C. lipolytica*