Odabir biološki aktivnih komponenti iz biljnih ekstrakata

Tutek, Klaudia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:525348

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODABIR BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENTI IZ BILJNIH EKSTRAKATA

DIPLOMSKI RAD

KLAUDIA TUTEK

Matični broj: 97

Split, studeni 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET SPLIT

DIPLOMSKI STUDIJ ORGANSKE KEMIJE I BIOKEMIJE

ODABIR BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENTI IZ BILJNIH EKSTRAKATA

DIPLOMSKI RAD

KLAUDIA TUTEK

Matični broj: 97

Split, studeni 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

MASTER STUDY OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

SELECTION OF BIOLOGICAL ACTIVE COMPONENTS FROM PLANT EXTRACTS

DIPLOMA TESIS

KLAUDIA TUTEK

Parent number: 97

Split, november 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij organske kemije i biokemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: dr.sc. Ivana Carev
Pomoć pri izradi: dr.sc. Ivana Carev, ing. Vladimir Jelaska, prof.dr.sc. Mile Dželalija, mag.chem. Mateo Glumac

ODABIR BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENTI IZ BILJNIH EKSTRAKATA

Klaudia Tutek, 97

Sažetak:

Centaurea triumfettii All. (eng. Squarrose knapweed) pripada porodici *Asteracea* i zeljasta je višegodišnja biljka trajnica. Cilj ovog diplomskog rada bio je izolirati eterično ulje iz osušenog biljnog materijala *C. triumfettii*, metodom hidrodestilacije, korištenjem modificirane aparature po Clavenger-u. Kemijski sastav eteričnog ulja *C. triumfetii* utvrđen je instrumentalnom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC/MS). U eteričnom ulju *C. triumfettii* identificirano je ukupno 30 komponenti koje čine 87,2% ukupnog ulja. Spojevi s najvećim prisustvom su heksadekanska kiselina (11,1%), spatulenol (10,8%), longifolen (8,8%) i germakren D (8,4%), zatim slijede aromadendren oksid (6,0%), linoleinska kiselina (5,3%) i α-kadinol (4,5%). Kako bismo dobili informaciju o spojevima koji se nalaze u sastavu eteričnog ulja *C. triumfetii* i njihovom potencijalnom antimikrobnom učinku; prikupljeni su do sada istraženi podaci o antimikrobnom djelovanju eteričnih ulja *Centaurea* vrsta i obrađeni statistički, korištenjem poznatih informatičkih alata za obradu podataka. Sveukupno je obuhvaćeno 30 različitih eteričnih ulja od 27 *Centaurea* vrsta koja su testirana na gram-pozitivnim, gram-negativnim bakterijama te gljivicama. Fokus našeg istraživanja bio je na bakterijama *E. coli* i *S. aureus*. Dominanti kemijski spojevi iz eteričnog ulja *C. triumfettii*, heksadekanska kiselina, longifolen, aromadendren oksid i linoleinska kiselina, ne nalaze na popisu spojeva koji imaju značajnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom. Germakren D, spatulenol i α-kadinol se pojavljuju sa značajnom korelacijom na antimikrobni učinak, no skup podataka iz kojih je izašla ova informacija je malen i dobivene rezultate treba uzeti s oprezom. Navedene korelacije kemijskih spojeva koji se nalaze u sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, koje se povezuju sa antimikrobnim učinkom, mogu služiti kao smjernica u istraživanju, te nikako ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su navedeni spojevi zaista odgovorni za antimikrobni učinak dok ne ispitamo njihovo djelovanje u obliku čistih spojeva.

Ključne riječi: *Centaurea triumfettii*, eterično ulje, antimikrobna aktivnost, informatički alati
Rad sadrži: 41 stranica, 15 slika, 7 tablica, 52 literaturne reference
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Mladen Miloš - predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Mila Radan - član
3. dr. sc. Ivana Carev - mentor

Datum obrane: 26.11.2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 33

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Master study of organic chemistry and biochemistry

Scientific area: Natural science
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28
Mentor: Ivana Carev, PhD
Technical assistance: Ivana Carev, PhD, Assistant prof., Vladimir Jelaska, B.S.c, Prof. Mile Dželalija, Mateo Glumac, M.Sc.chem.

SELECTION OF BIOLOGICAL ACTIVE COMPONENTS FROM PLANT EXTRACTS

Klaudia Tutek, 97

Abstract: *Centaurea triumfettii* All. (Squarrose knapweed), is a herbaceous perennial plant who belongs to *Asteracea* family. The aim of this thesis was to isolate the essential oil from the dried plant material *C. triumfettii*, using the hydrodistillation method and modified Clavenger apparatus. Chemical composition was analyzed by coupled system gas chromatography-mass spectrometry (GC / MS). In the *C. triumfettii* essential oil, a total of 30 components were identified, being 87.2% of the total oil. The compounds with the highest yield were hexadecanoic acid (11.1%), spathulenol (10.8%), longifolene (8.8%) and germacrene D (8.4%), followed by aromadendrene oxide (6.0%). linoleic acid (5.3%) and α-cadinol (4.5%). In order to obtain information on the chemical compounds in the *C. triumfetii* essential oil and their antimicrobial effect; the data on the antimicrobial activity of *Centaurea* essential oils have been investigated to date and processed statistically using known IT tools for data processing. In total, 30 different essential oils of 27 *Centaurea* species have been tested for gram-positive, gram-negative bacteria and fungi. Focus of our research was on microbes *E. coli* and *S. aureus.* The dominant compounds of *C. triumfettii* essential oil, hexadecanoic acid, longifolene, aromadendrene oxide and linoleic acid are not on the list of chemical compounds that have a significant correlation with the antimicrobial effect. Germacrene D, spatulenol, and α-cadinol appear to have a significant correlation to the antimicrobial effect, but the data set from which this information was extracted is small and the results should be taken with caution. The above correlations of the chemical compounds found in the *Centaurea* species essential oils, which are associated with antimicrobial activity, can serve as a guideline for research, and we cannot say with certainty that these compounds are indeed responsible for the antimicrobial effect until we examine their effect in form pure compounds.

Keywords: *Centaurea triumfettii*, essential oil, antimicrobial activity, informatics tools
Thesis contains: 41 pages, 15 figures, 7 tables, 52 references
Original in: Croatian

Defence committee:

1. Mladen Miloš, Prof. – chair person
2. Mila Radan, PhD, Associate professor - member
3. Ivana Carev, PhD - supervisor

Defence date: November 26th, 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom dr.sc. Ivane Carev tijekom mjeseca srpnja, 2019. godine.

Iskreno zahvaljujem svim članovima Zavoda za biokemiju, a posebno svojoj mentorici dr.sc. Ivani Carev na pomoći, stručnim savjetima i strpljenju pri izradi ovog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim najbližima, obitelji i prijateljima, na neizmjernoj podršci tijekom studiranja.

Klaudia Tutek

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA:

1. *Izolacija eteričnog ulja iz osušenog biljnog materijala* C. triumfettii *metodom hidrodestilacije, korištenjem modificirane aparature po Clavenger-u.*
2. *Određivanje kemijskog sastava i sadržaja eteričnog ulja* C. triumfettii*, korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC/MS).*
3. *Određivanje kemijskih spojeva sa značajnim korelacijama sa antimikrobnim učinkom, iz prethodno istraženih* Centaurea *vrsta korištenjem informatičkih alata.*
4. *Određivanje prisutnosti kemijskih spojeva sa značajnim korelacijama sa antimikrobnim učinkom u izoliranom ulju* C. triumfettii.

SAŽETAK:

Centaurea triumfettii All. (eng. Squarrose knapweed) pripada porodici *Asteracea* i zeljasta je višegodišnja biljka trajnica čiji su cvjetovi plavo-ljubičaste boje, tamniji u disku, a svjetliji u cvjetnim zrakama. Morfološka karakteristika koja ju razlikuje od drugih vrsta su blijede fimbrije duže od širine ruba i manje zadebljanje korijena. Biljke roda *Centaurea* koriste se kao izvori prirodnih lijekova u narodnoj medicini. Cilj ovog diplomskog rada bio je izolirati eterično ulje iz osušenog biljnog materijala *C. triumfettii*, iz prirodne populacije sa planine Velebit, metodom hidrodestilacije, korištenjem modificirane aparature po Clavenger-u. Kemijski sastav eteričnog ulja *C. triumfetii* utvrđen je instrumentnom tehnikom vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC/MS).

U eteričnom ulju *C. triumfettii* identificirano je ukupno 30 komponenti koje čine 87,2% ukupnog ulja. Spojevi s najvećim prisustvom su heksadekanska kiselina (11,1%), spatulenol (10,8%), longifolen (8,8%) i germakren D (8,4%), zatim slijede aromadendren oksid (6,0%), linoleinska kiselina (5,3%) i α-kadinol (4,5%).

Kako bismo dobili informaciju o spojevima koji se nalaze u sastavu eteričnog ulja *C. triumfetii* i njihovom antimikrobnom učinku; prikupljeni su do sada istraženi podaci o antimikrobnom djelovanju eteričnih ulja *Centaurea* vrsta i obrađeni statistički, korištenjem poznatih informatičkih alata za obradu podataka. Sveukupno je obuhvaćeno 30 različitih eteričnih ulja od 27 *Centaurea* vrsta koja su testirana na gram-pozitivnim, gram-negativnim bakterijama te gljivicama. Fokus našeg istraživanja bio je na bakterijama *E. coli* i *S. aureus.* Dominanti kemijski spojevi iz eteričnog ulja *C. triumfettii,* heksadekanska kiselina, longifolen, aromadendren oksid i linoleinska kiselina, ne nalaze na popisu spojeva koji imaju značajnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom. Germakren D, spatulenol i α-kadinol se pojavljuju sa značajnom korelacijom na antimikrobni učinak, no skup podataka iz kojih je izašla ova informacija je malen i dobivene rezultate treba uzeti s oprezom. Navedene korelacije kemijskih spojeva koji se nalaze u sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, koje se povezuju sa antimikrobnim učinkom, mogu služiti kao smjernica u istraživanju, te nikako ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su navedeni spojevi zaista odgovorni za antimikrobni učinak dok ne ispitamo njihovo djelovanje u obliku čistih spojeva.

Ključne riječi: *Centaurea triumfettii,* eterično ulje, antimikrobni učinak, informatički alati

SUMMARY:

Centaurea triumfettii All. (Squarrose knapweed), belong to *Asteracea* family, and is a herbaceous perennial plant whose flowers are blue-purple in color, darker in disc and lighter in floral rays. The morphological characteristic distinguishing it from other species is pale fimbriae longer than the width of the margin and less thickening of the roots. *Centaurea* plants are used as sources of herbal remedies in folk medicine.

The aim of this thesis was to isolate the essential oil from the dried plant material *C. triumfettii*, from the natural population of Mount Velebit, using the hydrodistillation method, using a modified Clavenger apparatus. Chemical composition was analyzed by coupled system gas chromatography-mass spectrometry (GC / MS). In the *C. triumfettii* essential oil, a total of 30 components were identified, being 87.2% of the total oil. The compounds with the highest yield were hexadecanoic acid (11.1%), spathulenol (10.8%), longifolene (8.8%) and germacrene D (8.4%), followed by aromadendrene oxide (6.0%). linoleic acid (5.3%) and α-cadinol (4.5%).

In order to obtain information on potential antimicrobial effect of the chemical compounds in the *C. triumfetii* essential oil; the data on the antimicrobial activity of *Centaurea* essential oils have been investigated to date and processed statistically using common IT tools for data processing. In total, 30 different essential oils of 27 *Centaurea* species have been tested for gram-positive, gram-negative bacteria and fungi. Focus of our research was on microbes *E. coli* and *S. aureus.* The dominant compounds of *C. triumfettii* essential oil, hexadecanoic acid, longifolene, aromadendrene oxide and linoleic acid are not on the list of chemical compounds that have a significant correlation with the antimicrobial effect. Germacrene D, spatulenol, and α-cadinol appear to have a significant correlation to the antimicrobial effect, but the data set from which this information was extracted is small and the results should be taken with caution. The above correlations of the chemical compounds found in the *Centaurea* species essential oils, which are associated with antimicrobial activity, can serve as a guideline for research, and we cannot say with certainty that these compounds are indeed responsible for the antimicrobial effect until we examine their effect in form pure compounds.

Keywords: *Centaurea triumfettii,* All., essential oil, antimicrobial effect, informatics tools

SADRŽAJ:

1. OPĆI DIO ... 1

1.1. Porodica *Asteracea* ... 1

1.2. Rod *Centaurea* ... 2

1.2.1. *Centaurea triumfettii* ... 4

1.3. Eterična ulja ... 5

1.3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja ... 5

1.3.1.1. Terpeni ... 6

1.3.1.2. Monoterpeni ... 7

1.3.1.3. Seskviterpeni ... 8

1.3.2. Određivanje kemijskog sastava eteričnog ulja – GC/MS ... 9

1.3.3. Biološka aktivnost eteričnih ulja ... 10

1.3.3.1. Antimikrobna aktivnost ... 11

1.3.3.2. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja ... 11

1.3.3.3. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja roda *Centaurea* ... 12

1.3.3.3.1. *Staphylococcus aureus* ... 12

1.3.3.3.2. *Escherichia Coli* ... 13

1.4. Informatički alati za obradu podataka ... 14

2. EKSPERIMENTALNI DIO ... 15

2.1. Biljni materijal ... 15

2.2. Izolacija eteričnog ulja ... 16

2.3. GC/MS ... 17

3. REZULTATI I RASPRAVA ... 18

3.1. Kemijski sastav eteričnog ulja *C. triumfetii* ... 18

3.2. Sastav eteričnih ulja vrsta roda *Centaurea* testiranih na antimikrobni učinak ... 23

4. ZAKLJUČAK ... 35

5. LITERATURA: ... 37

1. OPĆI DIO

1.1. Porodica *Asteracea*

Porodica *Asteracea*, glavočike, predstavlja vrlo brojnu porodicu cvjetnjača široko rasprostranjenih diljem svijeta. Javlja se sa 25.000 vrsta u tropskim, suhim i polusuhim područjima. Većina vrsta iz porodice *Asteracea* su zeljaste biljke, no značajan broj biljaka javlja se u obliku grmova ili drveća. U Hrvatskoj se u sastavu ove porodice nalazi 120 rodova sa 753 vrste.

Glavočike su zeljaste biljke, sa izrazito sitnim cvjetovima koji oblikuju glavičasti cvat (otuda i ime glavočike). Cvatovi su cvjetoliki, pa se greškom smatraju cvjetovima.[1] Ovojni listovi tvore okrugli, sferični ili cilindrični ovoj te mogu biti duguljasti ili lancetasti. Privjesci ovojnih listova dolaze u više redova, preklapaju se i uglavnom su čvrsti. Mogu biti različitih oblika, okrugli, duguljasti ili trokutasti, obli ili s oštrim završetkom, s bodljom ili rjeđe bez nje. Upravo su ti privjesci najvažniji za određivanje i međusobno razlikovanje vrsta.[2]

Porodica glavočika se dijeli u dvije zasebne skupine:

- Cjevastocvjetne glavočike (*Asteraceae, Compositae tubuliflorae)* u glavicama imaju samo cjevaste cvjetove ili se na obodu nalaze i jezičasti cvjetovi. Obuhvaća oko 80 rodova: ambrozija, čičak, ivančica, kamilica, krizantema, neven, različak, runolist, smilje.
- Jezičastocvjetne glavočike *(Cichoriaceae, Compositae liguliflorae)* u glavici imaju jezičaste cvjetove. U Hrvatskoj je ova skupina zastupljena s oko 25 rodova npr. dimak, lavlji zub, maslačak, runjika, vodopija

Mnoge vrste, posebice one koje obitavaju u sušnijim krajevima, imaju dug i jak korijen. Neke vrste imaju samo cvjetne zrake, npr. maslačak (*Taraxacum*) dok ostali imaju samo cvjetne plodove, npr. čičak (*Carduus*) i kukuruzni orah (*Centaurea cyanus*) [3]

Glavočike imaju veliku ekonomsku vrijednost, jer se koriste za proizvode značajne za prehrambenu, kozmetičku, farmaceutsku i ostale industrije. Njihovu široku primjenu im omogućava njihova velika rasprostranjenost i hortikulturni uzgoj. Mnoge glavočike su ljekovite poput nevena, kamilice, stolisnika i maslačka. Veliki cvatovi glavočika raznovrsnih su boja i omiljene su ukrasne biljke, poput krizantema, dalija, nevena, tratinčica, cinija i kadifica. [1]



Slika 1: Neke od vrsta glavočika koje rastu na području Republike Hrvatske: maslačak (*Taraxacum officinale*) i buhač (*Tanacetum cinerariifolium);* (Autor: Ivana Carev)

1.2. Rod *Centaurea*

Najbrojniji rod porodice *Astaraceae* su *Centaurae* (zečine, eng „*basketflowers*“). Uglavnom su samonikle, višegodišnje i medonosne biljke. Postoji preko 2000 vrsta, neke su vrlo raširene (*C. jacea* L.), dok su druge izraziti endemi (*C. ragusina* L.). U Hrvatskoj raste više endema biljaka roda *Centaurea*, i to uglavnom u mediteranskom djelu koji obuhvaća obalu,

otoke te planinska područja Biokovo, Velebit i Dinaride [4]. Prema podacima FCD (Flora Croatica Database / Hrvatska flora / Flora of Croatia) u Hrvatskoj brojimo 88 vrsta iz roda *Centaurea.* Zbog dugotrajne cvatnje (obično 2 – 3 mjeseca) i raznovrsnih i lijepih boja, često se uzgajaju kao ukrasne. [5]

Cvijet im se sastoji od glavica sitnih usko nabijenih cvatova. Stabljika je uspravna, visine od 25-60 cm. Glavica cvata se često sastoji od dva dijela, diska u kojem cijev vijenca završava u pet kratkih zuba, te cvjetnih zraka. Kada su prisutne obje vrste floreta, cvjetovi diska formiraju sredinu glavice, a cvjetne zrake su raspoređene po rubu. Cvatovi mogu biti raznolikih boja u rasponu od intenzivno plave, crvene, žute, do bilo koje mješavine ovih boja te bijele. Često su cvjetovi diska mnogo tamniji ili svjetliji od cvjetnih zraka koji se također razlikuju po morfologiji i sterilni su. Svaka glavica leži iznad fimbrija nalik na čašu ili košaru odakle i sam naziv „*basketflowers*“.[6]



Slika 2. Neke od *Centaurea* vrsta koje rastu na području Republike Hrvatske (autor: Ivana Carev)

Gledajući općenito na morfološke značajke, vrste roda *Centaurea* mogu se opisati kao jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje biljke, koje rijetko dolaze kao niski grmovi s trnovitim granama ili grmovi s trajno zelenim listovima.Cvjetni vjenčić može biti različite boje: ružičast, ljubičast, plav ili žut. [1] *Centaurea* vrste su robusne biljke dugog i jakog korijena, naročito one koje obitavaju u sušim krajevima. [6] Listovi su im često pustenasti, hrapavi do oštri s višestaničnim dlakama. Često su izmjenično razdijeljeni, ali pri bazi još uvijek povezani, ponekad i s uškama. [1]

1.2.1. *Centaurea triumfettii*

Centaurea triumfettii (eng. Squarrose knapweed) je zeljasta višegodišnja biljka trajnica koja može narasti do 60 cm. Uspravna duga stabljika sa šiljastim dugim listovima podijeljenima u izdužene režnjeve pri dnu koji su cjeloviti pri vrhu. Cvjetovi su plavo-ljubičaste boje, tamniji u disku, a svjetliji u cvjetnim zrakama. Cvatovi u obliku lijevka sjede iznad gomile ljuskastih fimbrija. Cvate od svibnja do srpnja na sunčanim stjenovitim planinskim staništima. [7]



Slika 3: Istraživana biljka *Centaurea triumfettii*, sa vrha Zečnjak, Velebit, 2019., primjerak u prirodnom staništu i osušeni biljni materijal u laboratoriju (Autor: Ivana Carev i Klaudia Tutek)

Autor Allioni je prvi put opisao *C. triumfettii* sa područja Alpi. Prema Allioniu, *C. triumfettii* karakteriziraju bijele fimbrije te razgranata, ravna i kutna stabljika sa oštrim listovima. Morfološka karakteristika koja je razlikuje od drugih vrsta su blijede fimbrije duže od širine ruba i manje zadebljanje korijena. Prema Dostal (1976) i Meusel i Jager (1992), opća distribucija *C. triumfettii* subsp. *triumfettii* pokriva južnu i središnju Europu, uključujući Francusku, Švicarsku, Italiju, Sloveniju, Hrvatsku, Bugarsku i Slovačku. [8]

1.3. Eterična ulja

Eterična ulja su smjese kemijskih spojeva lako hlapljivih svojstava. Uglavnom se dobivaju iz aromatičnog bilja, voća i cvijeća.[9] Nastaju u biljnoj citoplazmi kao sekundarni metaboliti i mogu imati značajnu ulogu u zaštiti organizma od insekata, kod nedostatka vlage, hrane, prevelikog isušivanja i sl. Eterična ulja stvaraju se u listovima, cvjetovima, plodovima i korijenu, a rjeđe i u stabljici i kori. [5]

Svježe izolirana ulja su bezbojne ili blijedo-žućkaste boje, netopljiva u vodi, ali dobro topljiva u organskim otapalima poput etera, kloroforma i pentana. Odlikuju se intenzivnim karakterističnim mirisima, a iz aromatičnog se bilja izoliraju fizikalnim postupcima kao što su hidrodestilacija, ekstrakcija, hladno prešanje, a u novije vrijeme super-kritičnom fluid i vodenom ekstrakcijom. Prisutnost glavnih kemijskih spojeva je presudan faktor za specifične organo-leptičke karakteristike.[9] Eterična ulja pronalaze svoju ulogu u pripravi hrane kao začini i arome; parfema, te u ljekovitim pripravcima zbog farmakološkog djelovanja ili korekcije okusa i/ili mirisa.[10]

Kozmetička industrija je najveći potrošač eteričnih ulja za proizvodnju parfema i parfimiranje kozmetičkih i higijenskih proizvoda, sredstava za čišćenje i insekticida. Prehrambena industrija koristi ih kao arome i začinska ulja, a farmaceutska kao preparate ili sirovine za proizvodnju preparata. Farmaceutski pripravci na bazi eteričnih ulja upotrebljavaju se kao antiseptici, sedativi, sredstva za masažu i aromaterapiju. Industrija boja i lakova upotrebljava pigmente proizvedene na bazi eteričnih ulja. Organska kemija i biokemija koriste eterična ulja kao materijal za znanstvena istraživanja, za dobivanje izolata koji služe kao sirovina za proizvodnju umjetnih eteričnih ulja, te kao otapala za smole i voskove. [11]

1.3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Eterična ulja su složene smjese kemijskih spojeva koje sadrže različite kemijske komponente karakteristične za pojedine vrste. Proces sinteze eteričnih ulja izvodi se u plastidima i citoplazmi biljnih stanica putem više metaboličkih procesa, najčešće iz metil- D-eritritol-4-

fosfata (MEP), mevalonske kiseline i malonske kiseline. Faktori koji kvantitativno utječu na sastav eteričnog ulja pojedine biljke jesu vrijeme cvatnje, mineralna gnojidba, mjesto branja, klimatski uvjeti, organi iz kojih se izolira i same biljne vrste.[11]

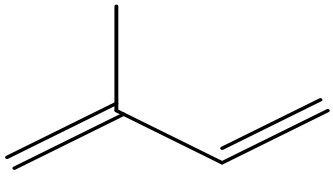
Glavni kemijski spojevi koji se nalaze u sastavu eteričnog ulja su aromatski i alifatski spojevi, te ugljikovodični terpeni (izopreni) i terpenoidi (izoprenoidi). Aromatski spojevi se javljaju rjeđe od terpena.

Općenito možemo reći, eterična ulja su smjese alifatskih, cikličkih, acikličkih, zasićenih i nezasićenih prirodnih organskih spojeva. Prema građi ugljikovog kostura, komponente eteričnih ulja dijele se u tri glavne skupine:

- terpeni
- fenilpropanski spojevi
- ostali spojevi

1.3.1.1. Terpeni

Terpeni su glavni sastojci eteričnih ulja. Osnovna građevna jedinica terpena je izopren, spoj od 5 ugljikovih atoma. Prekursor u metaboličkoj sintezi terpena je izopentil-difosfat (IPP), dok složeniji terpeni nastaju enzimsko kataliziranim povezivanjem izoprenskih jedinica (Slika 4). Prvo nastaje ugljikov kostur, a različite funkcijske skupine se povezuju na različite načine, ovisno o klasi terpena. Tako nastaju terpeni različitog broja ugljikovih atoma, odnosno izoprenskih jedinica (Tablica 1.).



Slika 4: Prikaz strukturne formule izoprenske jedinice

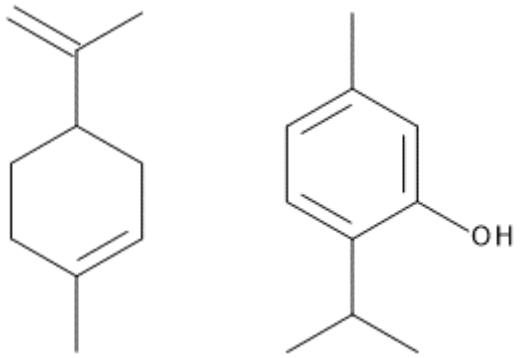
Tablica 1: Podjela terpena s obzirom na broj izoprenskih jedinica.

VRSTA	Broj C-atoma	Broj izoprenskih jedinica
semiterpeni	5	1
monoterpeni	10	2
seskviterpeni	15	3
diterpeni	20	4
triterpeni	30	6
tetraterpeni	40	8
politerpeni	5n	n

1.3.1.2.Monoterpeni

Cijeli set monoterpenskih spojeva nastao je metaboličkim procesima ciklizacije. Monoterpeni nastaju ciklizacijom prekursora geranil-pirofosfata (GPP) ili njegovog *cis*-izomera neril-pirofosfata (NPP). Ciklizacija se vrši po principu „glava-rep“, te mogu nastati aciklički, monociklički i biciklički monoterpeni. Uobičajene fizikalne karakteristike monoterpena su mala molekulska masa, niska viskoznost, velika hlapljivost i jake arome [(12)].

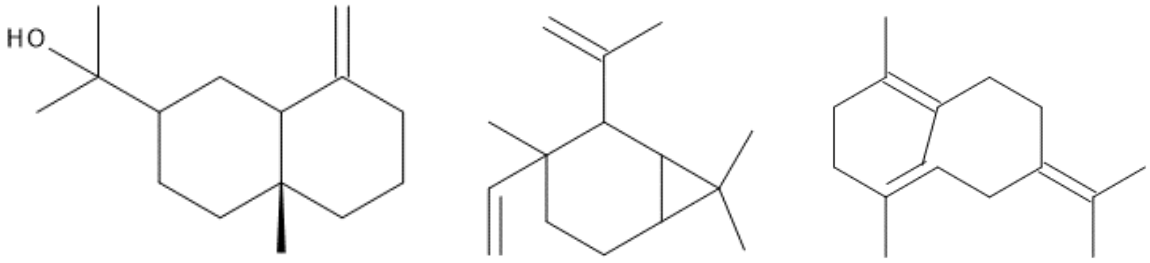
Neki od monoterpena identificiranih u eteričnom ulju *Centaurea* vrsta prikazani na Slici 5.



Slika 5: Strukturne kemijske formule monoterpena limonena i timola

1.3.1.3.Seskviterpeni

Seskviterpeni metabolički nastaju iz farnezil-pirofosfata koji može izomerizirati u odgovarajući alilni izomer, nerolidil-pirofosfat. Velikoj strukturnoj raznolikosti seskviterpena doprinosi vezanje funkcijskih skupina i supstituenata na ugljikovu kostur na različite regio- i stereospecifične načine.



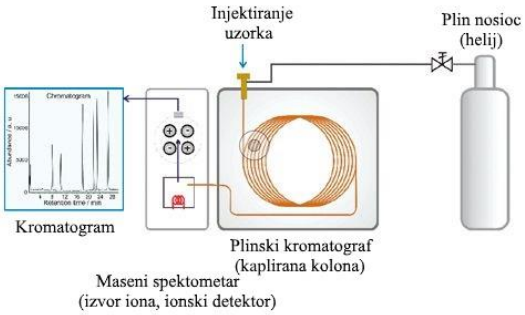
Slika 6: Strukturne kemijske formule seskviterpena bicikloelemena, *β*-eudezmola i germakrena B

1.3.2. Određivanje kemijskog sastava eteričnog ulja – GC/MS

Kromatografske tehnike koriste se za odjeljivanje, te za identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih spojeva u smjesama. Svim kromatografskim tehnikama zajedničko je postojanje stacionarne i mobilne faze. Tijekom analize dolazi do odjeljivanja sastojaka na temelju njihove različite brzine kretanja kroz mobilnu fazu, te na temelju afiniteta vezanja sastojaka za stacionarnu fazu. [5]

U svrhu analize i identifikacije sastojaka smjese hlapljivih spojeva najčešće se koristi vezani sustav plinska kromatografija – masena spektrometrija (engl. *gas chromatography/mass spectrometry*; GC/MS). Tom instrumentnom tehnikom moguće je odvojiti i identificirati sastojke iz kompleksne smjese uzoraka. Tehnika je pogodna za identifikaciju male količine uzoraka hlapljivih spojeva. Smjesa koja se želi razdvojiti mora biti termički stabilna, te se injektira u struji plina pri povišenoj temperaturi, pri čemu dio isparava u plinu. Plin struji i odnosi uzorak na kolonu gdje, kao i pri kromatografiji na stupcu dolazi do niza adsorpcija na stacionarnu fazu i ponovnog isparavanja tvari u mobilnu fazu. Zbog različite hlapljivosti i polarnosti pojedine komponente imaju različit koeficijent razdiobe, pa različitim brzinama putuju kolonom. Na taj način razdvojene čiste komponente izlaze iz kolone. [5]

Nakon što komponente napuste kromatografsku kolonu, ioniziraju se masenim spektrometrom. Ionizirane molekule zatim se ubrzavaju i razdvajaju na temelju različitih omjera masa-naboj (m/z).[13] Na izlazu iz kolone nalazi se detektor na kojem se dobivaju podaci o ovisnosti koncentracije uzorka o vremenu ili volumenu dodane faze. Taj ispis funkcije koncentracije tvari u ovisnosti o vremenu ili volumenu eluacije naziva se kromatogram. [13][14] Shematski prikaz GC/MS analize prikazan je na Slici 7.



Slika 7: Shematski prikaz GC/MS analize[14]

1.3.3. Biološka aktivnost eteričnih ulja

Danas je poznato više od 3000 eteričnih ulja od kojih je 300 komercijalno važno. Neka eterična ulja sadrže komponente koje mogu imati ljekovita svojstva. Istraživanja o načinu biološkog djelovanja eteričnih ulja omogućava napredak u njihovom korištenju u različite svrhe. [15]

Biljke roda *Centaurea* koriste se kao biljni lijekovi u narodnoj medicini zbog svog antireumatskog, protuupalnog, diuretskog, antipiretičnog, citotoksičnog te antibakterijskog djelovanja. Korištenje eteričnih ulja može imati zdravstvene pogodnosti za korisnika, jer su oni dobar izvor fitokemikalija, uključujući fenolne spojeve i sekviterpene. [16][17]

Polifenolni spojevi i seskviterpenski laktoni su kemijske skupine spojeva koje su izazvale veliko zanimanje zbog svojih farmakoloških djelovanja. Ovi spojevi su povezani s prevencijom degenerativnih bolesti, kao što su dijabetes, demencija i kardiovaskularne bolesti, kao i različitih vrsta tumora, gdje djeluju putem inhibicije tumorske inicijacije i progresije, uslijed moduliranja gena uključenih u ključne regulacijske procese. [18] Polifenoli mogu imati povoljan učinak na ljudsko zdravlje jer imaju antioksidativno, citotoksično i antitumorsko djelovanje. Seskviterpenski laktoni su poznati po tome što posjeduju značajan protuupalni i citotoksični učinak. Predlaže se da bi α-metilen-γ-laktonski dio u molekuli mogao biti odgovoran za njihov protuupalni učinak.[19]

1.3.3.1. Antimikrobna aktivnost

Nekoliko je čimbenika koji određuju antimikrobnu aktivnost, a to su stanje bakterijske stanice (osjetljivost i otpornost, tolerancija, upornost i biofilm), veličina inokuluma, koncentracija antibiotika, te njegovo djelovanje u serumu i interakciji s mikrobiomom crijeva domaćina. [20] Osjetljivost i otpornost mjeri se najmanjom inhibicijskom koncentracijom pojedine kemijske komponente potrebne za antimikrobni učinak na bakteriju (MIC). MIC je definirana kao minimalna koncentracija antibiotika koja inhibira rast bakterija. MIC se obično određuje izlaganjem definirane količine bakterijske populacije nizu povećanih koncentracija antibiotika u standardiziranom mediju za rast oko 16-20 sati. [21] Tolerancija je sposobnost bakterije da ostane živa u brzom izlaganju antibioticima, što se odnosi samo na baktericidne antibiotike. [22] Vremenski ovisna otpornost bakterije opisuje svojstvo bakterije koja ima ili duže vrijeme kašnjenja ili sporiju stopu rasta od većine populacije. [23]

1.3.3.2. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja

Eterična ulja imaju gustoću manju od vode, te su hlapljive tekućine topljive u lipidima, rijetko obojene i topljive u organskim otapalima. Eterična ulja mogu sadržavati oko 20–60 komponenti u različitim koncentracijama gdje je nekoliko komponenti prisutno u visokim koncentracijama u odnosu na ostale komponente prisutne u tragovima. Važna karakteristika eteričnih ulja i njihovih sastojaka je hidrofobnost, koja im omogućuje interakciju s lipidima u staničnoj membrani bakterija i mitohondrija, čineći ih propusnijima za narušavanje staničnih struktura, što na kraju rezultira smrću bakterijske stanice uslijed istjecanja ključnih molekula i iona iz bakterijske stanice u velikoj mjeri. [24]

Uloga eteričnih ulja u prirodi je zaštita biljaka domaćina djelovanjem antigljivičnih, antibakterijskih, antivirusnih i insekticidnih svojstava, a također i zaštita od biljojeda. [25]

Masovna upotreba antibiotika rezultirala je pojavom rezistencije, što je još jedan problem koji utječe na javno zdravlje. Neke od glavnih bakterija s višestrukom otpornošću koje

spadaju u kategoriju patogena su *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella spp, Staphylococcus, Shigella, Enterococcus sp.* i *Escherichia coli.* [25]

Stoga je potraga za novim izvorima antimikrobnih biološki aktivnih tvari još uvijek aktualna.

1.3.3.3. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja roda *Centaurea*

Prethodne studije na vrstama *Centaurea* pokazale su da su seskviterpeni, diterpeni, masne kiseline i derivati ugljikovodika glavne komponente ispitivanih eteričnih ulja. U mnogim vrstama *Centaurea* heksadekanska kiselina je pronađena kao spoj s najvećim prisutstvom.. Osim heksadekanske kiseline ističu se kariofilen oksid, *β*-kariofilen, germakren D, spatulenol, *β*-eudesmol, *α*-linolenska kiselina, *γ*-kadinol, *α*-humulen, globulol. [26,27,36–42,28–35]

Eterična ulja *Centaurea* vrsta do sada ispitana na antimikrobni učinak, uglavnom su djelovala antimikrobno na gram-pozitivne patogene (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus aureus, Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermis*). Među gram-negativnim patogenima ističu se *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, među gram-pozitivnim *Staphylococcus aureus,* a od gljivica *Candida albicanis.* [26,27,36–42,28–35]

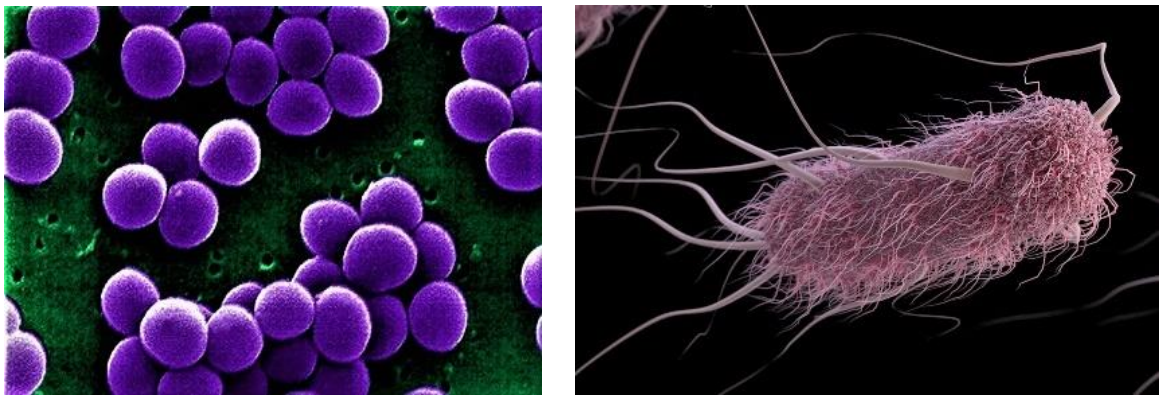
1.3.3.3.1. *Staphylococcus aureus*

Stafilokoki su bakterije čije ime opisuje njihov okrugli oblik (lat. *cocci*) grupiran u nakupine nalik grozdovima (grč. *staphyle*). Ova skupina bakterija može živjeti na koži ljudi i u okolišu i ne uzrokovati nikakve bolesti, dok ostale vrste ovih bakterija mogu izazivati ozbiljne infekcije. *Staphylococcus aureus* je najopasniji oblik bakterije stafilokoka. Kožne infekcije su najčešće bolesti izazvane ovom bakterijom, a također često uzrokuje upale pluća, infekcije srčanih zalistaka i infekcije kostiju. Infekcije ovim bakterijama su liječene mnogim vrstama antibiotika, te su mnoge vrste postale otporne na sve, osim na najjače antibiotike. Stafilokok koji se ne može liječiti jednom skupinom uobičajenih antibiotika naziva se MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). MRSA i druge otporne vrste stafilokoka postaju sve češće i sve ih je teže liječiti. [43] Potrebno je razlikovati kolonizaciju od infekcije izazvane sa MRSA.

Kolonizacija je stanje kada bolesnik ima na svom tijelu MRSA, ali nema kliničke znakove ili simptome bolesti. Osoba kolonizirana s MRSA može biti privremeni ili stalni kliconoša. Infekcija se događa kada MRSA uđe u tkivo i tu se umnožava, što dovodi do pojave simptoma bolesti. To se obično manifestira vrućicom, povećanim brojem bijelih krvnih stanica, te pojavom gnoja u rani ili tjelesnim šupljinama. [44]

1.3.3.3.2. Escherichia Coli

Escherichia coli je vrsta bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* i široko je rasprostranjena u prirodi. Pripada grupi bakterija koje su uobičajeni stanovnici crijeva mnogih životinja i ljudi, gdje pomažu u probavi hrane. Ubraja se u grupu tzv. koliformnih bakterija tj. bakterija koje se redovito ili vrlo često nalaze u ljudskoj stolici i koje pri sanitarnim pregledima vode i namirnica služe kao indikatori fekalne kontaminacije tj. zagađenja. To je štapićasta gram-negativna bakterija, neki sojevi imaju kapsulu, dok većina na površini ima izdanke (flagele), pa su pokretne. Aerobna je i fakultativno anaerobna bakterija (što znači da može rasti bez kisika, ali ga može iskoristiti ako je prisutan) te dobro uspijeva u laboratorijskim uvjetima. Pripada prilično otpornim bakterijama: mjesecima može živjeti u vodi i zemlji, a dugo na raznim predmetima. Toplina od 60°C ubija je nakon 15 min. [45]



Slika 8: Stanice bakterija *Staphylococcus aureus* [46] i *Escherichia Coli* [47]

1.4. Informatički alati za obradu podataka

Microsoft Excel je program za tablično računanje, proizvod kompanije *Microsoft,* sastavni je dio programskog paketa *Microsoft Office*. *Microsoft Excel* uglavnom služi za rješavanje problema matematičkog tipa pomoću tablica i polja koje je moguće povezivati različitim formulama. Može poslužiti i za izradu jednostavnijih baza podataka. Na temelju unesenih podataka, lako iz tablica može stvarati grafikone. Također omogućuje dodavanje različitih objekata: tablica, slika, grafikona. [48] Uvrštavanjem velikog skupa podataka moguće je izraditi jednostavnu bazu podataka, kako bismo podatke obradili statistički i interpretirali u svrhu znanstvenog istraživanja. Jedan od načina izražavanja međuovisnosti varijabli u jednostavnoj bazi podataka je koeficijent korelacije. Statistički značaj vrijednosti korelacije govori da je vjerojatnost između dvije korelacije manja od 0.05, te rezultat upućuje na postojanje uzročno-posljedične veze. Ovaj koeficijent se može izračunati korištenjem informatičkog alata *Excel* u *Microsoft office* paketu. [48] Koeficijent korealacije govori o tome koliko su dvije varijable u međuovisnosti jedna o drugoj. Koeficijent korelacije nalazi se između vrijednosti -1 i +1. [48]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

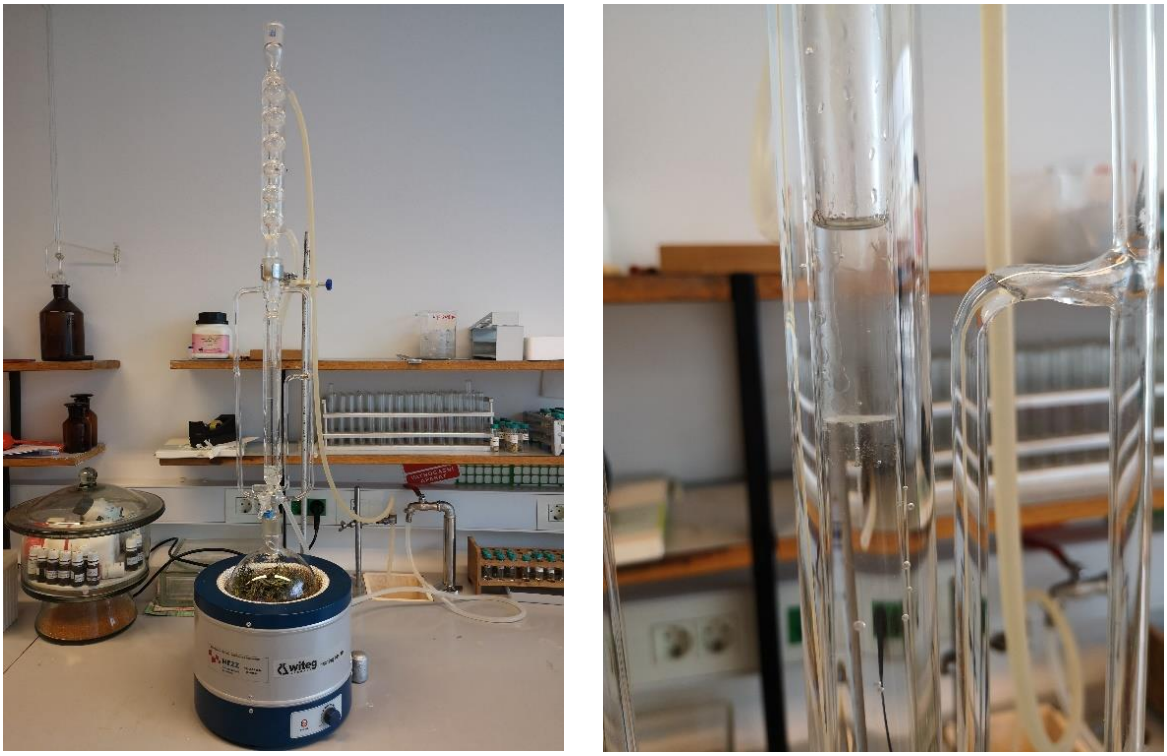
Biljni materijal prikupljen je planini Velebit, vrh Zečnjak, u lipnju 2019. godine. Za istraživanje su korišteni cvjetovi, stabljike i listovi *C. triumfetti* prethodno osušeni na sobnoj temperaturi, na svježem zraku kroz dva dana, u laboratoriju Zavoda za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta (Slika 9.).



Slika 9. Osušeni biljni materijal *C. triumfettii*

2.2. Izolacija eteričnog ulja

Izolacija eteričnog ulja rađena je u srpnju 2019. godine. Za izolaciju eteričnog ulja iz biljnog materijala *C. triumfetti* korištena je metoda hidrodestilacije u modificiranoj aparaturi po Clavenger-u (Slika 10). Biljni uzorak koji sadrži eterično ulje bio je u direktnom kontaktu s kipućom vodom pri atmosferskom tlaku. Eterično ulje destiliralo se zajedno s vodom, vodene pare nosile su uzorak kroz hladilo koje omogućava kondenzaciju, a eterično ulje hvatano je u tzv. „klopku“ organskih otapala dietiletera i pentana. Nedostatak ove metode je stvaranje artefakata zbog utjecaja vode i/ili visoke temperature. Unatoč tome, ova metoda izolacije eteričnih ulja je brza, jednostavna i često korištena. [49]



Slika 10: Aparatura za hidrodestilaciju, aparat po Clavenger-u i klopka organskih otapala pentana i dietiletera

2.3. GC/MS

Mjerenja su vršena koristeći plinski kromatograf model 3900 (tvrtke Varian Inc., LakeForest, CA, SAD) sa spektrometrom masa (MS), Varian Inc., model 2100T (slika 10). Za analize je korištena nepolarna kapilarna kolona VF-5MS dužine 30m×0,25mm debljine stacionarne faze 0,25mm. Temperaturni program za VF-5MS kolonu bio je kroz 3 minute izoterman na 60ºC, zatim se povisio na 246ºC stopom od 3ºC min^{-1} i zadržao izotermno kroz 25 min na toj temperaturi. Nosač plina bio je helij, sa stopom protoka 1mL min^{-1}, temperaturom injektora od 250ºC, injekcijskim volumenom od 1 µL; omjerom raspodjele od 1:20. Ionizacijska voltaža masenog spektrometra bila je 70 eV, raspon skeniranja masa: 40-350 masenih jedinica i temperatura izvora iona od 200ºC.



Slika 11: Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC/MS)

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Kemijski sastav eteričnog ulja *C. triumfetii*

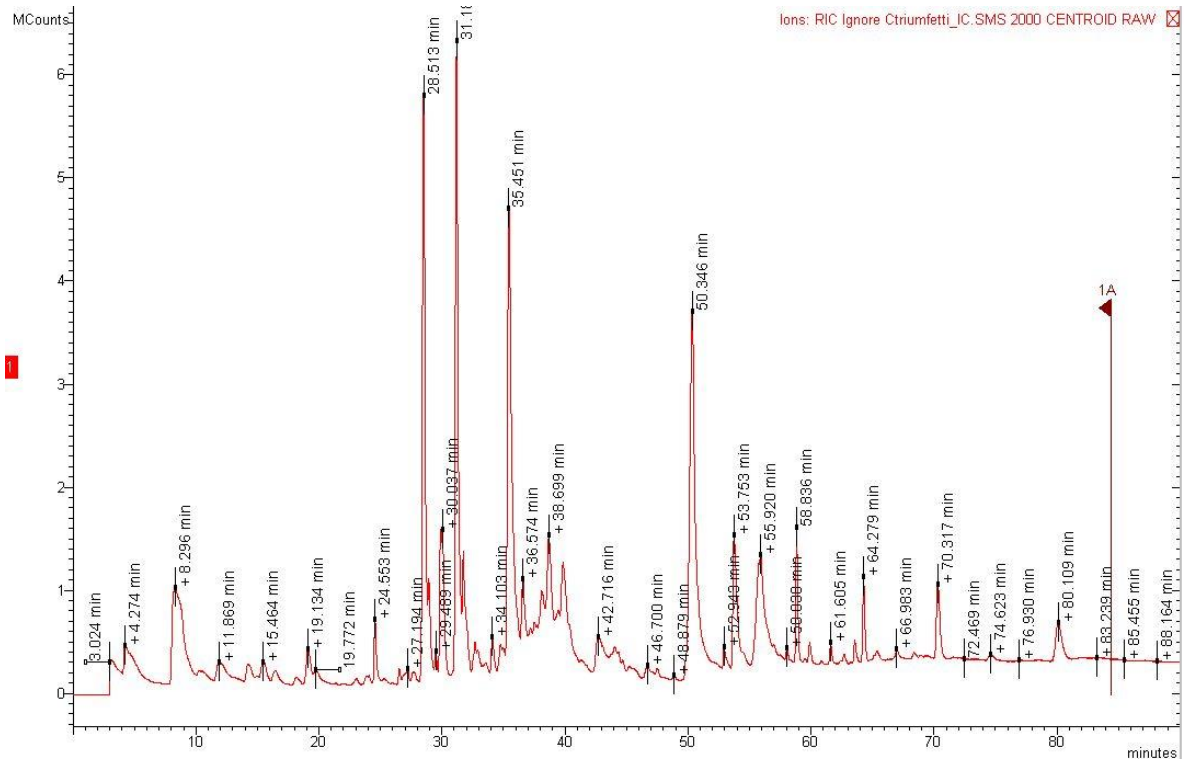
Eterično ulje iz prethodno osušenih cvjetova i zelenih dijelova biljne vrste *C. triumfettii* izolirano je destilacijom vodenom parom uz pomoć modificirane aparature po Clavenger-u.

Kemijska analiza napravljena je vezanim sustavom plinska kromatografija - spektrometrija masa (GC/MS) uz korištenje VF-5MS kromatografske kolone. Identifikacija pojedinih spojeva izvršena je na osnovi vremena zadržavanja pojedinih spojeva na koloni, tj. retencijskih vremena (Rt) i iz njih izračunatih Kovačevih indeksa (KI). Usporedbom KI sa poznatim literaturnim vrijednostima za svaku pojedinu komponentu, te usporedbom spektra masa dobivenih spojeva sa spektrima masa spojeva u Wiley i NIST bazama podataka, identificirani su kemijski spojevi.

Na slici 12. prikazan je kromatogram ukupne ionske struje istraženog eteričnog ulja, a u tablici 2. prikazan je kemijski sastav eteričnog ulja, maseni udjeli pojedinih komponenti, KI vrijednosti i način identifikacije. Maseni udio pojedine komponente izražen je postotkom i predstavlja udio površine pika toga sastojka u ukupnoj površini pikova svih kemijskih spojeva u sastavu istraživanog eteričnog ulja.

U eteričnom ulju *C. triumfettii* identificirano je ukupno 30 komponenti koje čine 87,2% ukupnog ulja.

Spojevi s najvećim prisustvom su heksadekanska kiselina (11,1%), spatulenol (10,8%), longifolen (8,8%) i germakren D (8,4%), zatim slijede aromadendren oksid (6,0%), linoleinska kiselina (5,3%) i α-kadinol (4,5%).



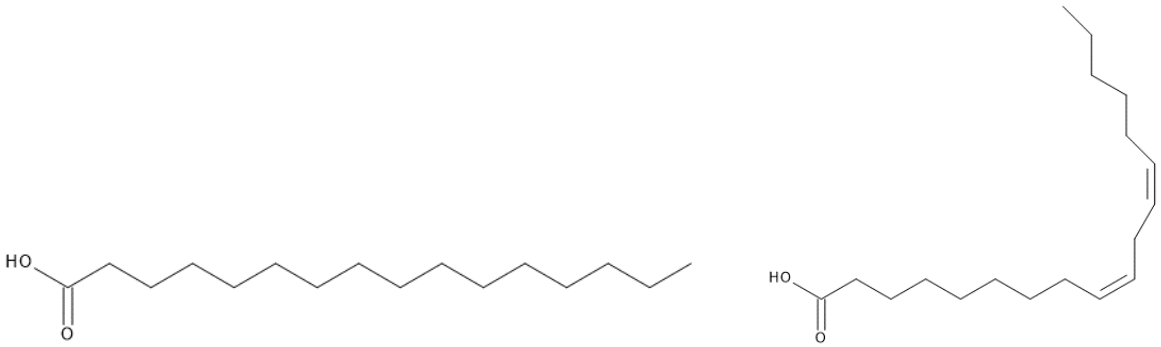
Slika 12: Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja *C. triumfettii*

Tablica 2: Kemijski sastav i sadržaj hlapljivih spojeva eteričnog ulja *C. triumfettii*

	Naziv komponente	%,*w*	KI	Način identifikacije
Terpenski spojevi				
Oksidirani monoterpeni				
1.	linalool	0,5	1090	KI, MS
2.	α-terpineol	0,6	1112	KI, MS
3.	γ-terpineol	0,7	1195	KI, MS
Neoksidirani seskviterpeni				
4.	bicikloelemen	0,9	1305	KI, MS
5.	β-ilangen	0,2	1351	KI, MS
6.	α-kopaen	0,3	1374	KI, MS
7.	longifolen	8,8	1395	KI, MS
8.	aromadendren	1,4	1420	KI, MS
9.	β-kariofilen	2,3	1444	KI, MS
10.	germakren D	8,4	1467	KI, MS
11.	pačulen	2,3	1490	KI, MS
Oksidirani seskviterpeni				
12.	δ-kadinol	1,0	1540	KI, MS
13.	spatuletnol	10,8	1565	KI, MS
14.	kariofilen oksid	2,1	1589	KI, MS
15.	τ-kadinol	2,3	1642	KI, MS
16.	α-kadinol	4,5	1668	KI, MS
17.	aromadendren oksid	6,0	1694	KI, MS
Oksidirani diterpeni				
18.	fitol	2,9	2077	KI, MS

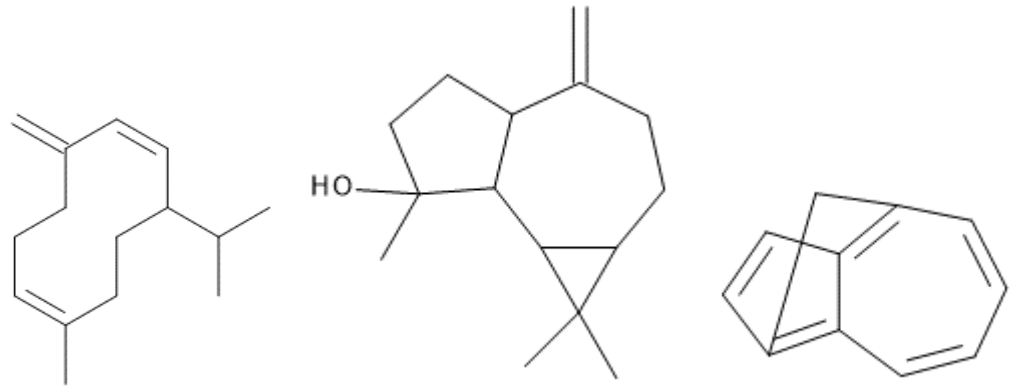
Neterpenski spojevi				
Aldehidi				
19.	benzaldehid	4,9	953	KI, MS
20.	benzacetaldehid	1,2	1048	KI, MS
Kiseline				
21.	heksadekanska kiselina	11,1	1983	KI, MS
22.	linolenska kiselina	5,2	2143	KI, MS
23.	oleinska kiselina	1,6	2244	KI, MS
Ugljikovodici				
24.	trikozan	0,7	2300	KI, MS
25.	tetrakozan	0,5	2400	KI, MS
26.	pentakozan	1,7	2500	KI, MS
27.	heksakozan	1,8	2600	KI, MS
28.	heptakozan	0,6	2700	KI, MS
29.	oktakozan	1,6	2800	KI, MS
30.	nonakozan	0,3	2900	KI, MS
TOTAL		**87,2**		

Među dominantnim spojevima, heksadekanska kiselina (Slika 13.) pronađena je kod velikog broja *Centaurea* vrsta čija su eterična ulja testirana na antimikrobnu aktivnost i predstavlja jedan od najučestalijih spojeva u sastavu eteričnog ulja ovih vrsta. [34,36,38,42] Od ugljikovodičnih spojeva, linoleinska kiselina se također nalazi među dominantnim spojevima eteričnog ulja *C. triumfetii*. Ova kiselina također je česta među dominantnim spojevima u sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta testiranih na antimikrobni učinak. [31,39,42]



Slika 13: Heksadekanska kiselina i linoleinska kiselina

Seskviterpeni spatulenol i germakren D, pronađeni kao dominantni spojevi u eteričnom ulju *C. triumfetii* (Slika 14.), iznimno su česti spojevi u sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta testiranih na antimikrobni učinak. [27,29,41,42,50,51,30–33,35,36,38,40] Zanimljivo je uočiti da vrste *C. aladagensis* i *C. behen* čija su eterična ulja testirana na antimikrobni učinak, u sastavu svojih eteričnih ulja nemaju navedena dva spoja. [37,39]

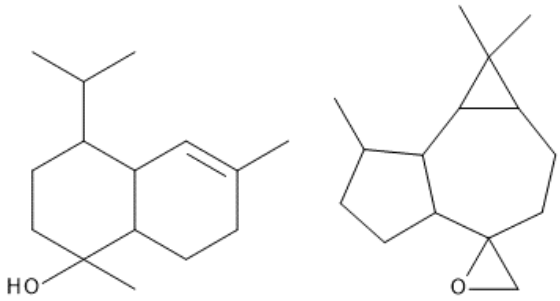


Slika 14: Germakren D, spatulenol i longifolen

Oksidirani seskviterpen longifolen (Slika 14.) se među dominantnim spojevima, do sada javio samo kod vrste *C. haussknetchii* (0,1%) i *C. solstitialis* (3,6%) čije je eterično ulje testirano na antimikrobnu aktivnost, i to u vrlo malom udjelu, dok je u eteričnom ulju *C. triumfetii* bio zastupljen značajnije.

Aromadendren oksid (Slika 15.) se među dominantnim spojevima, do sada javio samo kod vrste *C. damascena* (0,4%) čije je eterično ulje testirano na antimikrobnu aktivnost, i to u vrlo malom udjelu, dok je u eteričnom ulju *C. triumfetii* bio zastupljen značajnije. [41]

Oksidirani seskviterpen *α*-kadinol (Slika 15.) također je spoj koji nije često zastupljen kod *Centaurea* vrsta čija su eterična ulja testirana na antimikrobni učinak i pronađen je kod *C. pullata* (0,7%), *C. pulcherrima* (5,8%) i *C. affinis* (1,7%) u sastavu eteričnog ulja gdje nije bio dominantan spoj [35,36,41]. U sastavu eteričnog ulja *C. triumfetii* nalazi se u značajnijem udjelu.



Slika 15: Aromadendren oksid i *α*-kadinol

3.2. Sastav eteričnih ulja vrsta roda *Centaurea* testiranih na antimikrobni učinak

Kako bismo dobili informaciju o potencijalnom antimikrobnom učinku pojedinačnih spojeva iz eteričnog ulja *C. triumfetii*; prikupljeni su do sada istraženi podaci o antimikrobnom djelovanju eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, složeni u jednostavnu bazu podataka i obrađeni statistički u svrhu ovog znanstvenog istraživanja. Za obradu jednostavne baze podataka korišten je poznati informatički alat za obradu podataka *Excel* u radnom paketu *Microsoft office*. Međuovisnosti varijabli udjela pojedine kemijske komponente i njenog doprinosa u antimikrobnom učinku, u jednostavnoj bazi podataka izražena je koeficijentom korelacije koji se kretao u rasponu od -1 do +1.

.

Prilikom izrade ovog diplomskog rada, za statističku obradu prikupljeni su do sada istraženi podaci o antimikrobnom djelovanju eteričnih ulja *Centaurea* vrsta. Sveukupno je obuhvaćeno 30 različitih eteričnih ulja *Centaurea* vrsta: *C. rupestris, C. solstitialis, C. ragusina, C. sessilis, C. armena, C. nicaensis, C. parlatoris, C. amanicole, C. consaguinea, C. rosimopappa, C. appendicigera, C. helenoides, C. pannonica, C. jacea, C. pullata, C. grisebachii spp. grisebachii, C. afinis, C. pulcherrima var. pulcherrima, C. behen, C. cinerarria ssp. umbrosa, C. napifolia, C. aladagensis, C. damascena, C. haussknetchii, C. tomantella, C. lycopifolia, C. cheriolopha*. [27,28,38–42,51,52,29–33,35–37]

Gotovo sva navedena eterična ulja testirana su na set gram-pozitivnih, gram-negativnih bakterija, a dio njih i na gljivice. Statistički gledano, eterična ulja su uglavnom djelovala antimikrobno na gram-pozitivne patogene (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis, Bacillus aureus, Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermis*). Među gram-negativnim bakterijama, koje su pokazale osjetljivost na antimikrobni učinak eteričnih ulja, ističu se *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, a od gljivica *Candida albicanis.* Većina eteričnih ulja testirana je na *Escherichia coli i Staphylococcus aureus* [27,28,38–42,51,52,29–33,35–37]

Podaci o kemijskom sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, testiranih na antimikrobni učinak, iz objavljenih znanstvenih radova, koji su korišteni za obradu podataka, prikupljeni su u *Excel* tablicu. Prilikom obrade podataka, korišteni su znanstveni radovi koji su prilikom testiranja antimikrobnog učinka eteričnih ulja *Centaurea* vrsta koristili istu metodu ispitivanja i način izražavanja antimikrobnog učinka na bakterije. Tako su prilikom obrade podataka grupirana eterična ulja *Centaurea* vrsta testirana na antimikrobni učinak, čija je antimikrobna aktivnost izražena preko MIC vrijednosti, dok su u drugoj skupini bila eterična ulja čija je antimikrobna aktivnost izražena preko zona inhibicije (ZI). Ovakav način grupiranja podataka je pokušaj standardizacije podataka kako bi njihova interpretacija bila što kvalitetnija i točnija.

Budući da od 16 znanstvenih radova, koja uključuju 30 *Centaurea* vrsta, nisu sva eterična ulja testirana na sve i iste vrste mikroorganizama, kako bi podatke mogli usporediti, uzeli smo u obradu eterična ulja *Centaurea* vrsta testirana na gram-negativnu bakteriju *E. coli* i gram-pozitivnu bakteriju *S. aureus*. Navedene bakterije iznimno su važne za istraživanja

antimikrobnog učinka zbog svoje značajne patogenosti, te je potraga za novim izvorom antibiotika na navedene bakterije od iznimne važnosti.

Nakon grupiranja podataka za sastav eteričnog ulja *Centaurea* vrsta prema korištenoj metodi za ispitivanje antimikrobnog učinka, *in silico* istraživanjem, korištenjem informatičkih alata i statističkom obradom podataka, dobivene su kemijske komponente koje se nalaze u sastavu eteričnog ulja, a mogu se povezati sa antibakterijskim učinkom eteričnih ulja *Centaurea* vrsta na bakterije *E. coli* i *S. aureus*. Korištenjem koeficijenata korelacije, stavljeni su u međuovisnost kemijski sastav eteričnog ulja *Centaurea* vrsta i antimikrobni učinak eteričnih ulja *Centaurea* vrsta na bakterijske vrste *E. coli* i *S. aureus*.

Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja različitih vrsta *Centaurea* posljedica je njihovog kemijskog sastava. Različito antimikrobno djelovanje često se povezuje sa dominantnim spojevima eteričnih ulja, stoga ja cilj ovog diplomskog rada bio utvrditi točnost ove tvrdnje. Također je cilj bio utvrditi koji spojevi iz prethodno istraživanih eteričnih ulja imaju snažnu međuovisnost sa antimikrobnom aktivnosti, te mogu biti povezani sa istom. Sljedeći korak bio je utvrđivanje tih spojeva u sastavu istraživanog eteričnog ulja *C. triumfetii*.

Obradom prikupljenih literaturnih podataka o utjecaju eteričnih ulja *Centaurea* vrsta na *E. coli*, izraženim preko MIC vrijednosti, 11 eteričnih ulja od 8 *Centaurea* vrsta pokazalo je antimikrobni učinak. *Centaurea* vrste čiji je antibakterijski učinak na *E. coli* izražen preko MIC vrijednosti u rasponu od 50 - 500 µl/ml su: *C. rupestris, C. solstitialis, C. ragusina, C. amanicola, C. consanguinea, C. grisebachii, C. pullata, C. affinis, C. aladagensis* te su u Tablici 3. prikazane korelacije značajnih kemijskih spojeva. [27–29,32,35,39]

Obradom podataka za kemijski sastav devet eteričnih ulja *Centaurea* vrsta testiranih na *E. coli,* gdje je antimikrobni učinak izražen preko MIC vrijednosti, uočeno je nekoliko statistički značajnih apsolutnih korelacija između spojeva u sastavu eteričnog ulja i toksičnosti na bakterije. Spojevi γ-kadinen, benzil benzoat i fitol nalazili su se u sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta koje su pokazale snažnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom na *E. coli*. Osim njih, još nekoliko u manjem udjelu zastupljenih spojeva pokazalo je snažnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom: pentadekanska kiselina, fenilacetaldehid, naftalen, α-kopaen, germakren B i heksahidrofarnezil aceton. Iz dobivenih podataka, s obzirom na iznose korelacija, može se zaključiti da pentadekanska kiselina ima najznačajniju korelaciju sa

antimikrobnim učinkom eteričnog ulja i ona je značajan spoj za daljnja istraživanja na *E. coli*. Pentadekanska kiselina nije pronađena u sastavu eteričnog ulja istraživane *C. triumfettii*.

Tablica 3. Korelacija za značajne spojeve iz eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, testiranih na antimikrobni učinak na *E. coli* izražen preko MIC

	C. rupestris	C. rupestris	C. solstitialis	C. ragusina Flower	C. ragusina Leaf	C. amanicola	C. consanguinea	C. grisebachii	C. pullata	C. affinis	C. aladagensis	Korelacija
heksadekanska kiselina	3,2	18,7	26,1	0,8	0,3	15	14,2	1,5	0	0	39,3	0.091266
spatulenol	2,8	3,9	0	0	0	0,5	0	0,6	12,2	1,4	0	0,09361
longifolen	0	0	3,6	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,31785
germakren D	24,3	5,4	15,3	17,1	4,3	0	0	0,3	0	0	0	0,102776
aromadendren oksid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
linoleinska kiselina	1,7	11,8	17,9	0	0	5,2	5,7	0	0	1	0	-0,17171
***α*-kadinol**	0	0	0	0	0	0	0	0,7	0	1,7	0	0,346362
***γ*-kadinen**	0,4	0,4	0	0,2	0	0	0	0	0,8	0,3	0	0,66701
benzil benzoat	2,9	1,9	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0,607602
fitol	6,7	2,6	3,5	0,3	0,2	0	0	0	0	0,1	4	0,531952
naftalen	0	0	0	0	0	0,3	1,6	0	0	0	0	-0,40315
germakren B	0	0	0	1,6	0,7	0	8,3	0	0	0	0	-0,40846
fenilacetaldehid	0	0	0	0	0	3,3	1,1	0	0	0	0	-0,44241
heksahidrofarnezil aceton	0	0	0	0	0	6	13,5	0	0	0	0	-0,46519
***α*-kopaen**	0	0	0,5	0	0	1,7	1,3	0	0,2	0,7	0	-0,47538
pentadekanska kiselina	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0	0	0	0	-0,5055

Od navedenih kemijskih spojeva u sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, koji pokazuju korelaciju s antimikrobnim učinkom eteričnih ulja, kemijski spojevi fitol i *α*-kopaen pronađeni su i u sastavu eteričnog ulja *C. triumfettii* istraživanog u ovom diplomskom radu. Fitol je prethodno identificiran u sastavu 7 eteričnih ulja izoliranih iz 5 *Centaurea* vrsta: *C. rupestris, C. solstitialis, C. ragusina*, *C. affinis* i *C. aladagensis.* [27–29,35,39] Udio fitola u sastavu prethodno proučavanih eteričnih ulja značajan je i čini dominantan spoj samo kod vrste *C. rupestris.*[27] Kod vrste *C. triumfettii*, istraživane u ovom diplomskom radu, fitol je prisutan sa udjelom od 2,9%. Kemijski spoj *α*-kopaen, nalazi se u pet eterična ulja *Centaurea* vrsta: *C. solstitalis, C. amanicola, C. consanguinea, C. pullata* i *C. affinis.* [28,35,52]

U eteričnom ulju *C. triumfettii* istraživanom u ovom diplomskom radu, *α*-kopaen je identificiran sa udjelom od 0,3%.

Od spojeva koji su dominantni u sastavu eteričnog ulja *C. triumfetii* većina ih nije pokazala nikakve značajne korelacije sa antimikrobnim učinkom na *E. coli* izraženim preko MIC vrijednosti, dok su longifolen (8,8%) i posebno istaknuti *α*-kadinol (4,5%) pokazali blagu korelaciju.

Obradom prikupljenih literaturnih podataka o utjecaju eteričnih ulja *Centaurea* vrsta na *E. coli*, izraženim preko ZI vrijednosti, 3 eterična ulja od 3 *Centaurea* vrsta pokazalo je antimikrobni učinak. *Centaurea* vrste čiji je antibakterijski učinak na *E. coli* izražen preko ZI vrijednosti u rasponu od 5-7 mm su: *C. sessilis, C. armena* i *C. solstitialis* te su u Tablici 4. prikazane korelacije njihovih značajnih kemijskih spojeva. [30,31]

Tablica 4. Korelacija za značajne spojeve iz eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, testiranih na antimikrobni učinak na *E. coli* izražen preko ZI

	C. sessilis	**C. armena**	**C. solstitialis**	**Korelacije**
heksadekanska kiselina	0	0	12,8	1
germakren D	0	3,3	1,7	0,017493
longifolen	0	0	0	0
aromadendren oksid	0	0	0	0
linoleinska kiselina	0	0	0	0
***α*-kadinol**	0	0	0	0
spatulenol	4,9	3,9	0	-0,98118
kariofilen oksid	10	4,7	5	-0,45573
***β*-kariofilen**	1,3	5,4	0,4	-0,63904
benzaldehid	0,3	1,1	0	-0,71074
fitol	6,4	2	0	-0,74061
***cis*-geranil aceton**	1,1	2,2	0	-0,86603
farnesil aceton	0,7	1,2	0	-0,90993
***β*-eudezmol**	12,4	19,3	2,5	-0,91274
***α*-kopaen**	0.7	3,2	0,4	-1

Obradom podataka za kemijski sastav eteričnih ulja tri *Centaurea* vrste testirane na *E. coli* gdje je antimikrobni učinak izražen preko ZI vrijednosti, uočene su korelacije važnijih spojeva poput *α*-kopaena, spatulenola, *β*-kariofilena, *β*-eudezmola i benzaldehida koji su pokazali značajnu korelaciju sa antibakterijskim učinkom eteričnih ulja proučavanih *Centaurea* vrsta. Seskviterpen *α*-kopaen pokazao je najsnažniju korelaciju sa antimikrobnim

učinkom ispitivanih *Centaurea* vrsta, gdje je u do sada ispitanim eteričnim uljima imao manje udjele. Udio *α*-kopaena u ispitivanom eteričnom ulju *C. triumfetii* je u vrlo malom udjelu od 0,3%.

Važno je istaknuti da je sljedeći spoj koji je pokazao iznimno snažnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom prethodno testiranih *Centaurea* vrsta bio seskviterpen spatulenol. U kemijskom sastavu istraživanog eteričnog ulja *C. triumfettii,* spatulenol se nalazi među dominantnim spojevima sa značajnim udjelom od 10,8%.

Od ostalih spojeva koji su dominantni u sastavu eteričnog ulja *C. triumfetii* većina ih nije pokazala nikakve značajne korelacije sa antimikrobnim učinkom na *E. coli* izraženim preko ZI vrijednosti.

U kemijskom sastavu istraživanog eteričnog ulja *C. triumfettii,* od spojeva koji su pokazali značajniju korelaciju sa antimikrobnim učinkom na *E. coli* izraženim preko ZI vrijednosti, nalaze se još *β*-kariofilen (2,3%) i benzaldehid (4,9%).

Kariofilen oksid, spoj koji se često nalazi među dominantnim spojevima u sastavu eteričnog ulja *Centaurea* vrsta, pokazao je blažu korelaciju, te možemo reći da je i on u nekoj mjeri pridonio antibakterijskom djelovanju.

Važno je napomenuti da smo dobivene podatke dobili obrađivanjem malog skupa podataka, te ih ne možemo sa sigurnošću uzeti kao relevantne. U jednom radu nisu navedene točne vrijednosti zona inhibicije već raspon što otežava uspoređivanje. Stoga nam navedene korelacije mogu služiti kao smjernica u istraživanju, te nikako ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su navedeni spojevi zaista odgovorni za antimikrobni učinak dok ne ispitamo njihovo djelovanje u obliku čistih spojeva.

Obradom prikupljenih literaturnih podataka o utjecaju eteričnih ulja *Centaurea* vrsta na *S. aureus*, izraženim preko MIC vrijednosti, 7 eterična ulja od 5 *Centaurea* vrsta pokazalo je antimikrobni učinak. *Centaurea* vrste čiji je antibakterijski učinak na *S. aureus* izražen preko MIC vrijednosti u rasponu od 32-400 µl/ml su: *C. rupestris, C. solstitialis, C. ragusina, C. amanicola* i *C. aladagensis* te su u Tablici 5. prikazane korelacije značajnih kemijskih spojeva. [27–29,39,52]

Tablica 5. Korelacija za značajne spojeve iz eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, testiranih na antimikrobni učinak na *S. aureus* izražen preko MIC

	C.rupestris 6	C. rupestris 14	C. solstitialis 17	C. ragusina Flower	C. ragusina Leaf	C. amanicola	C. aladagensis	Korelacije
spatulenol	2,8	3,9	0	0	0	0,5	0	0,881511
germakren D	24,3	5,4	15,3	17,1	4,3	0	0	0,261411
heksadekanska kiselina	3,2	18,7	26,1	0,8	0,3	15	39,3	0,170455
linoleinska kiselina	1,7	11,8	17,9	0	0	5,2	0	0,169564
aromadendren oksid	0	0	0	0	0	0	0	0
***α*-kadinol**	0	0	0	0	0	0	0	0
longifolen	0	0	3,6	0	0	0	0	-0,16381
***β*-elemen**	0	0,4	0	0	0	0	0	0,594214
***β*-ilangen**	0	0,3	0,6	0	0	0	0	0,128065
kariofilen oksid	0	0	0	3,4	2,2	12	6,6	-0,50294
***γ*-muurolene**	0,1	0	0	9,1	3,2	0	0	-0,52994
izopropil miristat	0	0	0	0,3	0,1	0	0	-0,53082
***δ*-kadinen**	0	0	0	0,5	0,9	0	0	-0,53341
***trans-β*-farnezen**	0	0	0	3,5	1,4	0	0	-0,54572
***τ*-kadinol**	0	0	0	0,5	0,8	0	0	-0,5468
germakren B	0	0	0	1,6	0,7	0	0	-0,55294
***δ*-elemen**	0	0	0	2	3	0	0	-0,55363
dihidro-*cis*-*γ*-kopaen-8-ol	0	0	0	0,5	0,3	0	0	-0,57504
***β*-santalen**	0	0	0	0,6	0,4	0	0	-0,58023
oktadekan	0	0	0	0,3	0,2	0	0	-0,58023
heksadekan	0	0	0	0,2	0,2	0	0	-0,58259
***trans-α*-bergamoten**	0	0	0	3	2,7	0	0	-0,58505
dekanal	0	0	0,3	0,4	0,1	0,6	0	-0,75059

Obradom podataka za kemijski sastav sedam eteričnih ulja *Centaurea* vrsta testiranih na *S. aureus,* gdje je antimikrobni učinak izražen preko MIC vrijednosti, uočeno je nekoliko statistički značajnih korelacija između spojeva u sastavu eteričnog ulja i toksičnosti na bakterije. Korelacije dobivene za antimikrobni učinak eteričnih ulja *Centaurea* vrsta na *S. aureus* puno su značajnije od onih za *E. Coli.* Od zastupljenih spojeva dekanal je pokazao najsnažniju povezanost sa antimikrobnim učinkom eteričnih ulja, dok manju korelaciju ima i kariofilen oksid. Niz kemijskih spojeva koji su manje zastupljeni u eteričnim uljima istraženih *Centaurea* vrsta značajno koreliraju sa antimikrobnim učinkom eteričnog ulja, a to su: *δ*-elemen, *β*-ilangen, *β*-elemen, trans-*α*-bergamoten, *β*-santalen, *γ*-muurolen, *trans-β*-

farnezen, *δ*-kadinen, germakren B, kariofilen oksid, heksadekan, dihidro-*cis*-*γ*-kopaen-8-ol, *τ*-kadinol, oktadekan, izopropil miristat. Iz dobivenih podataka dekanal ima najznačajniju korelaciju sa antimikrobnim učinkom eteričnog ulja.

Dekanal se ne nalazi u sastavu istraživanog eteričnog ulja *C. triumfetii*. Od kemijskih spojeva koji pokazuju značajnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom, u sastavu eteričnog ulja istraživane *C. triumfettii* identificirani su *β*-ilangen (0,2%), *τ*-kadinol (2,3%) i kariofilen oksid (2,1%). Osim spatulenola, svi ostali kemijski spojevi koji se nalaze sa dominantnim udjelima u sastavu eteričnog ulja istraživane *C. triumphetii* nisu pokazali značajnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom.

Obradom prikupljenih literaturnih podataka o utjecaju eteričnih ulja *Centaurea* vrsta na *S. aureus*, izraženim preko ZI vrijednosti, 5 eteričnih ulja od 4 *Centaurea* vrste pokazalo je antimikrobni učinak. *Centaurea* vrste čiji je antibakterijski učinak na *S. aureus* izražen preko ZI vrijednosti u rasponu od 8-11 mm su: *C. sessilis, C. armena, C. pulcherrima* i *C. napifolia* te su u Tablici 6. prikazane korelacije značajnih kemijskih spojeva. (30,36,38)

Tablica 6. Korelacija za značajne spojeve iz eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, testiranih na antimikrobni učinak na *S. aureus* izražen preko ZI

	C. sessilis	**C. armena**	**C. pulcherrima**	**C. pulcherrima**	**C. napifolia**	**Korelacije**
heksadekanska kiselina	0	0	5,5	0,2	14,7	0,785706
aromadendren oksid	0	0	0	0	0	0
longifolen	0	0	0	0	0	0
spatulenol	4,9	3,9	0	0	0	-0,23822
linoleinska kiselina	0	0	2,2	0	0	-0,51605
***α*-kadinol**	0	0	5,8	4,4	0,4	-0,52611
germakren D	0	3,3	17,8	23,2	0,2	-0,53228
heksahidrofarnezil aceton	0	0	0,5	0,4	0	-0,56935
***δ*-kadinen**	0	0	1,6	1,1	0	-0,58109
***α*-kadinen**	0	0	0,2	0,1	0	-0,58977

Obradom podataka za kemijski sastav eteričnih ulja četiri *Centaurea* vrste testirane na *S. aureus* gdje je antimikrobni učinak izražen preko ZI vrijednosti, uočene su korelacije važnijih spojeva poput germakrena D, *α*-kadinena i *δ*-kadinena koji su pokazali snažnu korelaciju

sa antibakterijskim učinkom eteričnih ulja proučavanih *Centaurea* vrsta. Seskviterpen *α*-kadinen kao ni *δ*-kadinen nisu prisutni u sastavu eteričnog ulja istraživane *C. triumfetii*.

Od spojeva koji su pokazali značajnu korelaciju sa antibakterijskim učinkom u sastavu eteričnog ulja *C. triumfetii,* sa značajnim udjelom nalaze se germakren D (8,4%), *α*-kadinol (4,5%), linoleinska kiselina (5,3%) i spatulenol (10,8%).

Važno je istaknuti da je više spojeva među dominantnim spojevima pokazalo značajne korelacije sa antimikrobnim učinkom kod *S. aureus* nego kod *E. coli*. Iako je uočeno više korelacija između sastava eteričnog ulja *Centaurea* vrsta i antimikrobnog učinka pojedinih kemijskih spojeva, kao i kod proučavanih eteričnih ulja za *E. coli*, važno je napomenuti da smo dobivene podatke dobili obrađivanjem malog skupa podataka, te ih ne možemo sa sigurnošću uzeti kao relevantne. U jednom radu nisu navedene točne vrijednosti zona inhibicije već raspon što otežava uspoređivanje podataka, stoga nam navedene korelacije mogu služiti kao smjernica u istraživanju, te nikako ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su navedeni spojevi zaista odgovorni za antimikrobni učinak dok ne ispitamo njihovo djelovanje u obliku čistih spojeva.

Kada smo utvrdili koji spojevi iz prethodno istraživanih *Centaurea* eteričnih ulja imaju snažnu međuovisnost sa antimikrobnom aktivnosti, sljedeći korak bio je utvrđivanje tih spojeva u sastavu istraživanog eteričnog ulja *C. triumfetii* (Tablica 7). Tablica sadrži udjele svih spojeva u sastavu eteričnog ulja *C. triumfetii* i njihove korelacije sa antimikrobnim učinkom s obzirom na bakterije *E. coli* i *S. aureus* i način izražavanja antimikrobnog učinka bilo preko MIC ili ZI.

Koeficijent korelacije kod pojedinih spojeva kod kojih je testiranjem eteričnih ulja *Centaurea* antimikrobna aktivnost na obje bakterije izražena preko ZI, nedostajao je zbog malog skupa podataka koji su bili na raspolaganju prilikom izrade baze podataka. Relevantniji i potpuniji podaci dobiveni su obradom podataka i računanjem koeficijenata korelacije za kemijske spojeve u sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta gdje je testirana antimikrobna aktivnost na obje bakterije, izražena preko MIC vrijednosti.

Tablica 7. Spojevi iz eteričnog ulja *C. triumfettii* i njihove korelacije dobivene testiranjem *Centaurea* vrsta na antimikrobni učinak *E. coli* i *S. aureus* izražen preko MIC i ZI vrijednosti

Naziv komponente	Udio u eteričnom ulju *C.triumfettii*	*E.coli*, MIC	*S.aureus*, MIC	*E.coli*, ZI	*S.aureus*, ZI
benzaldehid	4,9	0,077202	-0,40521	-0,71074	-0,01449
benzacetaldehid	1,2	0,255813	/	-0,5	-0,64731
linalool	0,5	-0,12643	-0,33196	-0,5	-0,57864
***α*-terpineol**	0,6	-0,12643	-0,33196	/	-0,56212
***γ*-terpineol**	0,7	/	/	/	/
biciklоelemen	0,9	0,454852	0,83596	/	-0,44395
***β*-ilangen**	0,2	-0,09788	0,128065	/	/
***α*-kopaen**	0,3	-0,47538	-0,42116	-1	-0,47849
longifolen	8,8	-0,31785	-0,16381	/	/
***β*-kariofilen**	1,4	-0,02319	0,005908	-0,63904	-0,4281
aromadendren	2,3	-0,3391	-0,37055	/	/
germakren D	8,4	0,102776	0,261411	0,017493	-0,53228
pačulen	2,3	0,425788	0,594214	/	/
***δ*-kadinol**	1,0	/	/	/	/
spatulenol	10,8	0,09361	0,881511	-0,98118	-0,23822
kariofilen oksid	2,1	0,092398	-0,50294	-0,45573	-0,21828
***τ*-kadinol**	2,3	-0,395	-0,5468	/	/
α-kadinol	4,5	0,346362	/	/	-0,52611
aromadendren oksid	6,0	0,371519	/	/	/
heksadekanska kiselina	11,1	0,091266	0,170455	1	0,785706
fitol	2,9	0,531952	0,781357	-0,74061	-0,07881
***α*-linoleinska kiselina**	5,3	-0,17171	0,169564	/	-0,51605
oleinska kiselina	1,6	/	/	/	/
trikozan	0,7	0,283276	0,539017	1	0,955053
tetrakozan	0,5	0,225551	-0,11068	/	0,808791
pentakozan	1,7	0,421857	0,69766	1	0,955038
heksakozan	1,8	0,514738	0,803099	/	/
heptakozan	0,6	0,449393	0,854689	/	0,958373
oktakozan	1,6	0,59454	0,897669	/	/
nonakozan	0,3	0,265527	0,693139	/	/

Kemijski spojevi koji se nalaze u sastavu eteričnog ulja istraživane *C. triumfettii*, pokazuju različite korelacije s obzirom na načine kako je izražen antimikrobni učinak, kao i u odnosu na obje proučavane bakterije *E. coli* i *S. aureus*. Najveće razlike u iznosu korelacija uočavaju se promatranjem podataka za istu bakteriju gdje je antimikrobni učinak izražen na različite načine, preko MIC i ZI.

Proučavanjem svim kemijskih spojeva, uočava se da je *α*-kopaen pokazao značajnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom, kod obje bakterije, gdje je antimikrobni učinak izražen na oba načina.

Od ostalih spojeva prisutnih u eteričnom ulju *C. triumfettii*, najznačajniju korelaciju sa antimikrobnim učinkom, kod obje bakterije ističu se *τ*-kadinol (2,2%) i aromadendren (0,3%), no samo u slučaju kada je antimikrobni učinak izražen preko MIC.

Prethodni literaturni podaci, sugerirali su da su za antimikrobnu aktivnost odgovorni dominanti spojevi u sastavu eteričnih ulja, no naše istraživanje i usporedba sastava eteričnih ulja 30 *Centaurea* vrsta, pokazala je da značajnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom uglavnom ne pokazuju dominantni spojevi, uz pojedine iznimke. Tako je uočeno da se dominanti spojevi *C. triumfettii* heksadekanska kiselina, longifolen, aromadendren oksid, linoleinska kiselina ne nalaze na popisu spojeva koji imaju značajan antimikrobni učinak. Ova indikacija, osim što je i statistički potvrđena u ovom diplomskom radu, intuitivna je, budući da većina *Centaurea* vrsta sadrži u sastavu eteričnog ulja karakteristične dominante spojeve, iz čega bi proizašlo da sva ili većina eteričnih ulja imaju dobru antimikrobnu aktivnost ukoliko bi za antimikrobni učinak bili zaslužni dominantni spojevi. Iz eksperimentalnih podataka znamo da samo neka eterična ulja *Centaurea* vrsta imaju dobru antimikrobnu aktivnost, stoga je bilo potrebno utvrditi zajedničke spojeve koje posjeduju eterična ulja koja posjeduju antimikrobnu aktivnost kako bi se približili skupu podataka sa spojevima koji imaju utjecaj na ovaj učinak.

Spojevi germakren D i *α*-kadinol koji se nalaze u sastavu eteričnog ulja *C. triumfetii* mogu se dovesti u korelaciju sa antimikrobnim učinkom, no skup podataka koji je obrađen jako je mali, te se ne može sa sigurnošću uzeti kao relevantan.

Osim navedenog, važno je voditi računa o sinergističkom djelovanju pojedinih komponenti u sastavu eteričnog ulja, te interakciji pojedinih komponenti koje se nađu u ovoj smjesi spojeva.

Navedene korelacije kemijskih spojeva koji se nalaze u sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, koje se povezuju sa antimikrobnim učinkom, mogu služiti kao smjernica u istraživanju,

te nikako ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su navedeni spojevi zaista odgovorni za antimikrobni učinak dok ne ispitamo njihovo djelovanje u obliku čistih spojeva. Neki od spojeva sa značajnim antimikrobnim učinkom nalaze se u sastavu ispitivanog eteričnog ulja *C. triumfetii*, no u manjem udjelu od dominantnih spojeva.

Od istaknutih spojeva koji se dovode u korelaciju sa antimikrobnim učinkom, pentadekanska kiselina, dekanal, *α*-kopaen, *α*-kadinen, germakren D i *α*-kadinol, ni jedan nije istražen na antimikrobni učinka kao čisti spoj.

Stoga bi buduća istraživanja mogla uključiti istraživanje pojedinačnih spojeva koji su pokazali dobru korelaciju sa antimikrobnim učinkom, a potom ispitivanje eteričnog ulja *C. triumfetii* sa ciljem uspoređivanja antimikrobnog učinka smjese spojeva i čistih spojeva, kao i usporedbu sa već postojećim literaturnim podacima.

Prilikom obrade podataka i slaganja baze podataka za eterična ulja s antimikrobnim učinkom, javljale su se poteškoće prilikom obrade podataka budući da su različita eterična ulja korištena za ispitivanje antimikrobnog učinka na različite bakterije. Kada bi skup podataka sadržavao više eteričnih ulja od onih trenutno dostupnih, kao i da je antimikrobni učinak izražen na oba načina, preko MIC i ZI, obrada podataka bila bi relevantnija. Stoga su nove informacije o sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, kao i njihov antimikrobni učinak, značajni za buduća istraživanja.

4. ZAKLJUČAK

Znanstvenim istraživanjem u ovom diplomskom radu ispitivan je kemijski sastav eteričnog ulja *C. triumfettii* s ciljem pronalaženja kemijskih spojeva koji bi mogli imati potencijalno dobar antimikrobni učinak.

Eterično ulje izolirano je iz prethodno sasušenog biljnog materijala, sabranog na Velebitu, u ljeto 2019. godine, metodom hidrodestilacije korištenjem modificirane aparature po Clavenger-u.

Sastav eteričnog ulja određen je vezanim sustavom plinska kromatografija – masena spektrometrija (engl. *gas chromatography/mass spectrometry*; GC/MS).

U sastavu eteričnog ulja *C. triumfettii* nalaze se heksadekanska kiselina (11,1%), spatulenol (10,8%), longifolen (8,8%), germakren D (8,4%), aromadendren oksid (6,0%), linoleinska kiselina (5,3%) i α-kadinol (4,5%).

Kako bismo dobili informaciju o potencijalnom antimikrobnom učinku pojedinačnih spojeva iz eteričnog ulja *C. triumfetii*; prikupljeni su do sada istraženi podaci o antimikrobnom djelovanju na bakterije *E. coli* i *S. aureus* eteričnih ulja 30 *Centaurea* vrsta: *C. rupestris, C. solstitialis, C. ragusina, C. sessilis, C. armena, C. nicaensis, C. parlatoris, C. amanicole, C. consaguinea, C. rosimopappa, C. appendicigera, C. helenoides, C. pannonica, C. jacea, C. pullata, C. grisebachii spp. grisebachii, C. afinis, C. pulcherrima var. pulcherrima, C. behen, C. cinerarria ssp. umbrosa, C. napifolia, C. aladagensis, C. damascena, C. haussknetchii, C. tomantella, C. lycopifolia, C. cheriolopha*. Podaci prethodnih istraživanja složeni su u jednostavnu bazu podataka i obrađeni statistički, *in silico* istraživanjem, korištenjem poznatog informatičkog alata za obradu podataka *Excel* u radnom paketu *Microsoft office*.

Obradom podataka za kemijski sastav devet eteričnih ulja *Centaurea* vrsta testiranih na *E. coli,* gdje je antimikrobni učinak izražen preko MIC vrijednosti, uočeno je da jedino pentadekanska kiselina ima značajniju korelaciju sa antimikrobnim učinkom eteričnog ulja i ona se ne nalazi u istraživanom eteričnom ulju *C. triumfetii*.

Obradom podataka za kemijski sastav devet eteričnih ulja *Centaurea* vrsta testiranih na *S. aureus,* gdje je antimikrobni učinak izražen preko MIC vrijednosti, uočeno je da dekanal

ima značajniju korelaciju sa antimikrobnim učinkom eteričnog ulja i on se ne nalazi u istraživanom eteričnom ulju *C. triumfetii*.

Obradom podataka za kemijski sastav devet eteričnih ulja *Centaurea* vrsta testiranih na *E. coli,* gdje je antimikrobni učinak izražen preko ZI vrijednosti, uočeno je da *α*-kopaen ima značajniju korelaciju sa antimikrobnim učinkom eteričnog ulja i on se nalazi u istraživanom eteričnom ulju *C. triumfetii*.

Obradom podataka za kemijski sastav devet eteričnih ulja *Centaurea* vrsta testiranih na *S. aureus,* gdje je antimikrobni učinak izražen preko ZI vrijednosti, uočeno je da *α*-kadinen ima značajniju korelaciju sa antimikrobnim učinkom eteričnog ulja i on ne se nalazi u istraživanom eteričnom ulju *C. triumfetii*.

Od istraženih spojeva podaci za spojeve kod istraživanih eteričnih ulja gdje je antimikrobni učinak izražen preko MIC vrijednosti relevantniji su i pouzdaniji od podataka izraženih preko ZI zbog većeg skupa podataka.

Dominanti spojevi *C. triumfettii*, heksadekanska kiselina, longifolen, aromadendren oksid, linoleinska kiselina ne nalaze na popisu spojeva koji imaju značajnu korelaciju sa antimikrobnim učinkom. Germakren D i *α*-kadinol se pojavljuju sa značajnom korelacijom na antimikrobni učinak, no skup podataka iz kojih je izašla ova informacija je malen i dobivene rezultate treba uzeti s oprezom. Neki od spojeva sa značajnom korelacijom sa antimikrobnim učinkom nalaze se u sastavu ispitivanog eteričnog ulja *C. triumfetii,* no u manjem udjelu od dominantnih spojeva.

Navedene korelacije kemijskih spojeva koji se nalaze u sastavu eteričnih ulja *Centaurea* vrsta, koje se povezuju sa antimikrobnim učinkom, mogu služiti kao smjernica u istraživanju, te nikako ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su navedeni spojevi zaista odgovorni za antimikrobni učinak dok ne ispitamo njihovo djelovanje u obliku čistih spojeva. Od istaknutih spojeva koji se dovode u korelaciju sa antimikrobnim učinkom, pentadekanska kiselina, dekanal, *α*-kopaen, *α*-kadinen, germakren D i *α*-kadinol, ni jedan nije istražen na antimikrobni učinka kao čisti spoj.

5. LITERATURA:

1. Matić R., Morfološke karakteristike jednogodišnjih cvjetnih vrsta porodice *Asteraceae*, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 2017.
2. Gajšek A., Taksonomski status, rasprostranjenost, morfološke značajke i ugroženost vrsta roda *Centaurea* L. (*Asteraceae*) u Hrvatskoj, Šumarski fakultet Zagreb, 2018.
3. Uysal I., Celik S., Menemen Y., Morphology, Anatomy, Ecology, Pollen and Achene Features of *Centaurea polyclada* DC. (Sect. Acrolophus) in Turkey, J Biol Sci., 2005;5(2):176–80.
4. glavočike | Hrvatska enciklopedija (11.10.2019.)
5. Carev I., Fitokemijski i citogenetski profil odabranih biljaka roda *Centaurea* (*Asteraceae*), Zagreb, 2016.
6. Centaurea - Wikipedia (13.10.2019.)
7. Centaurea triumfettii | staudenfuehrer.de (17.10.2019.)
8. Olšavská K, Perný M, Mártonfi P, Hodálová I., *Cyanus triumfettii* subsp. *triumfettii* (*compositae*) does not occur in the western carpathians and adjacent parts of pannonia: Karyological and morphological evidence, Nord J Bot, 2009;27(1):21–36.
9. Loza-Tavera H., Monoterpenes in Essential Oils, 1999;(5):49–62.
10. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M., Biological effects of essential oils, Food Chem Toxicol, 2008;46(2):446–75.
11. Jerković I. Kemija i tehnologija aromatičnog bilja. Split; 2012.
12. Part 4: Terpene Hydrocarbons—Monoterpenes | dōTERRA Essential Oils (11.10.2019.)
13. Gas chromatography–mass spectrometry - Wikipedia (13.11.2019.)
14. TGA/STA-GC-MS Coupling - NETZSCH Analyzing & Testing (20.11.2019.)

15. Martínez AC., Biological activities of essential oils, Essent Oils Prod Appl Heal Benefits., 2018;May 2014:37–52.

16. Djeddi S, Argyropoulou C, Chatter R., Analgesic properties of secondary metabolites from Algerian *Centaurea pullata* and Greek *C.grisebachii* ssp. *grisebachii*, J Appl Sci Res., 2012;8(6):2876–80.

17. Patel K, Patel DK., Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of hispidulin: A concise report., J Tradit Complement Med

18. Pires TCSP, Dias MI, Barros L, Calhelha RC, Alves MJ, Oliveira MBPP, et al., Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential, Food Res Int., 2018;105:580–8.

19. Köse YB, İşcan G, Göger F, Akalın G, Demirci B, Başer KHC., Chemical Composition and Biological Activity of *Centaurea baseri:* New Species from Turkey, Chem Biodivers., 2016;1369–79.

20. Li J, Xie S, Ahmed S, Wang F, Gu Y, Zhang C, et al., Antimicrobial activity and resistance: Influencing factors, Front Pharmacol., 2017;8(JUN):1–11.

21. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, Nat Protoc. 2008;3(2):163–75.

22. Kester JC, Fortune SM. Persisters and beyond, Mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria, Crit Rev Biochem Mol Biol., 2014;49(2):91–101.

23. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S., Bacterial persistence as a phenotypic switch, Science (80-). 2004;305(5690):1622–5.

24. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives, Medicines, 2017;4(4):58.

25. Burt S., Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods, Int J Food Microbiol., 2004;94(3):223–53.

26. Bülent Köse Y, Iscan G, Demirci B., Antimicrobial Activity of the Essential Oils Obtained from Flowering Aerial Parts of *Centaurea lycopifolia* Boiss. et Kotschy and *Centaurea cheirolopha* (Fenzl) Wagenitz from Turkey, Essent Oil-Bearing Plants, 2016;19(3):762–8.

27. Carev I, Maravić A, Bektašević M, Ruščić M, Siljak-Yakovlev S, Politeo O., *Centaurea rupestris*. L.: Cytogenetics, essential oil chemistry and biological activity. Croat Chem Acta., 2018;91(1).

28. Carev I, Ruščić M, Skočibušić M, Maravić A, Siljak-Yakovlev S, Politeo O., Phytochemical and Cytogenetic Characterization of *Centaurea solstitialis* L. (*Asteraceae*) from Croatia, Chem Biodivers., 2017;14(2).

29. Politeo O, Skočibušić M, Carev I, Burčul F, Jerković I, Sarolić M, et al., Phytochemical profiles of volatile constituents from *Centaurea ragusina* leaves and flowers and their antimicrobial effects, Nat Prod Commun., 2012;7(8).

30. Yayli N, Yaşar A, Güleç C, Usta A, Kolaylı S, Coşkunçelebi K, et al., Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*, Phytochemistry, 2005;66(14):1741–5.

31. Lograda M., Chalard P., Figueredo G., Khalfoune K., Silin H.T.R, Lograda M., Chalard, P., Figueredo, G., Khalfoune, K., Silin, H.T.R., Phytochemistry, antibacterial activity and chromosome number of *Centaurea solstitialis* L. Grown in Algeria, Glob J Res Med Plants Indig Med., 2013;2:675–84.

32. Senatore F, Formisano C, Raio A, Bellone G, Bruno M., Volatile components from flower-heads of *Centaurea nicaeensis* All., *C.parlatoris* Helder and *C.solstitialis* L. ssp *schouwii* (DC.) Dostal growing wild in southern Italy and their biological activity, Nat Prod Res., 2008;22(10):825–32.

33. Yayli N, Yasar A, Albay C, Asamaz Y, Coskuncelebi K, Karaoglu S, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea appendicigera* and *Centaurea helenioides*, Pharm Biol., 2009;47(1):7–12.

34. Milošević T, Argyropoulou C, Mihailović V, Stanković M, Solujić S, Skaltsa H.,

Essential oil of *Centaurea pannonica* (Heufel) Simonkai and antioxidant activity of the methanol extract, Planta Med., 2010;76(12):1249.

35. Djeddi S, Soković M, Skaltsa H, S. Djeddi H. Skaltsa MS, Djeddi S, Soković M, Analysis of the Essential Oils of Some *Centaurea* Species *(Asteraceae)* Growing Wild in Algeria and Greece and Investigation of their Antimicrobial Activities, J Essent Oil Bear Plants, 2011;14(6):658–66.

36. Kahriman N.; Alpay, S.; Karaoğlu, Yayli, N. N., Antimicrobial activity and acomparative essential oil analysis of *Centaurea pulcherrima* Willd.var. *pulcherrima* extracted byhydrodistillation and microwavedistillation, Nat Prod Res Former Nat Prod Lett., 2012;26(8):703–12.

37. Esmaeili A, Panahi ZA, Ebrahimzadeh MA., Investigation of Phytochemistry of Gene of *Centaurea* Grown in Iran. J Essent Oil Bear Plants, 2014;17(5):806–12.

38. Senatore F, Rigano D, De Fusco R, Bruno M., Volatile components of *Centaurea cineraria* L. subsp umbrosa (*Lacaita*) Pign. and *Centaurea napifolia* L. (*Asteraceae*), two species growing wild in Sicily, Flavour Fragr J, 2003;18(3):248–51.

39. Bulent Kose Y, Iscan G, Demirci B, Baser KH, Celik S, Bülent Köse Y, Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis*, Fitoterapia, 2007;78(3):253–4.

40. Maurizio B., Modica A., Catinella G., Cem Canlı TA& SÇ., Chemical composition of the essential oils of *Centaurea tomentella* Hand.-Mazz. and *C. haussknechtii* Boiss. (*Asteraceae*) collected wild in Turkey and their activity on microorganisms affecting historical art craft, Nat Prod Res., 2018;33(8):1092–100.

41. Khaled M. Khleifat, Suzan A. Matar, Mohammad Jaafreh, Haitham Qaralleh MOA& KYA., Essential Oil of *Centaurea damascena* Aerial Parts, Antibacterial and Synergistic Effect, J Essent Oil Bear Plants, 2019;22(2):356–67.

42. Bülent Köse Y, Iscan G, Demirci B., Antimicrobial Activity of the Essential Oils Obtained from Flowering Aerial Parts of *Centaurea lycopifolia* Boiss. et Kotschy and *Centaurea cheirolopha* (Fenzl) Wagenitz from Turkey, J Essent Oil-Bearing

Plants, 2016;19(3).

43. Staphylococcus aureus Infections - Infections - MSD Manual Consumer Version (17.10.2019.)

44. Meticilin-rezistentni Staphylococcus aureus (MRSA), PZU Zavod za medicinsku dijagnostiku i ispitivanje (17.10.2019.)

45. E. coli infekcije – Javno zdravlje, Hrvatski zavod za javno zdravstvo (17.10.2019.)

46. Staphylococcus aureus - APIC, Association for proffesionals in infection control and epidemiology (13.11.2019.)

47. Blood type affects severity of diarrhea caused by E. coli – Washington University School of Medicine in St. Louis (13.10.2019.)

48. Wikipedia. In: wikipedia.org. (18.11.2019.)

49. Tutek K. Kemijski sastav i antikolinesterazna aktivnost eteričnih ulja dalmatinskog buhača. 2017.

50. Radan M, Carev I, Tešević V, Politeo O, Čulić VC., Qualitative HPLC-DAD/ESI-TOF-MS Analysis, Cytotoxic, and Apoptotic Effects of Croatian Endemic *Centaurea ragusina* L. Aqueous Extracts, Chem Biodivers., 2017.

51. Milošević T., Argyropoulou C., Solujić S., Murat-Spahić D., Skaltsa H., Milošević T., Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea pannonica* and *C. jacea*, Nat Prod Commun, 2010;5(10):1663–8.

52. Formisano C., Rigano D., Senatore F., Celik S., Bruno M., Rosselli S., Volatile constituents of aerial parts of three endemic *Centaurea* species from Turkey: *Centaurea amanicola* Hub.-Mor., *Centaurea consanguinea* DC. and *Centaurea ptosimopappa* Hayek and their antibacterial activities, Nat Prod Res, 2008;22(10):833–9.