

# Izolacija, kemijski sastav i biološka aktivnost eteričnih ulja pinja, primorskog bora i pukinje

---

Jelavić - Šako, Maša

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:167:856301>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-23**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**IZOLACIJA, KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST**  
**ETERIČNIH ULJA PINJA, PRIMORSKOG BORA I PUKINJE**

**DIPLOMSKI RAD**

**MAŠA JELAVIĆ ŠAKO**

**Matični broj: 91**

**Split, listopad 2019.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**  
**SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**IZOLACIJA, KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST  
ETERIČNIH ULJA PINJA, PRIMORSKOG BORA I PUKINJE**

**DIPLOMSKI RAD**

**MAŠA JELAVIĆ ŠAKO**

**Matični broj: 91**

**Split, listopad 2019.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**  
**COURSE: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**ISOLATION, CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL  
ACTIVITY OF STONE PINE, MARITIME PINE AND MARITIME  
JUNIPER ESSENTIAL OILS**

**DIPLOMA THESIS**

**MAŠA JELAVIĆ ŠAKO**

**Parent number: 91**

**Split, October 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij kemije; Smjer: Organska kemija i biokemija  
Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Franko Burčul, Izv. prof. dr. sc. Ana Maravić

### IZOLACIJA, KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA PINJA, PRIMORSKOG BORA I PUKINJE

Maša Jelavić Šako, 91

**Sažetak:** Pinj (*Pinus pinea* L.) i primorski bor (*Pinus pinaster* Aiton) svrstavaju se u porodicu borovki (Pinaceae). Odabrana vrsta iz porodice čempresovki (Cupressaceae) je pukinja (*Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa* Sibth. & Sm.). Ovim zimzelenim vrstama stanište je u mediteranskoj i submediteranskoj klimi. Izolacija eteričnih ulja provedena je metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru iz osušenih iglica navedenih vrsta. Potom su eterična ulja izravno analizirana vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). U eteričnom ulju primorskog bora i pukinje, najzastupljeniji spoj je bio monoterpen  $\alpha$ -pinen (redom, 28,52 % i 64,85 %), dok je u eteričnom ulju pinja najzastupljeniji spoj bio monoterpen limonen (42,57 %). Antioksidacijska aktivnost određena FRAP i DPPH metodama za analizirana izolirana eterična ulja je bila niska. Nadalje, sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze je određena metodom po Ellmanu. Pri najvećoj koncentraciji ulja od 22,72  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , za inhibiciju oba enzima najbolje rezultate su pokazala ulja primorskog bora i pukinje. Za enzim acetilkolinesterazu određena je inhibicija redom, 94,08% i 78,03%, a butirilkolinesteraze redom, 35,10 % i 35,90 %. Također je određena i antimikrobna aktivnost metodom mikrodilucije. Eterična ulja nisu pokazala jaku antibakterijsku aktivnost, ali zato su pokazala dobru antifungalnu aktivnost. Ističe se eterično ulje pukinje, s MIK vrijednošću ispod 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  prema bakterijama *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* i *S. pneumoniae* te obje vrste ispitivanih gljivica.

**Ključne riječi:** borovi, čempresi, eterična ulja, GC-MS, DPPH, FRAP, metoda po Ellmanu, antimikrobna aktivnost

**Rad sadrži:** 54 stranice, 29 slika, 14 tablica, i 36 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| 1. Doc.dr.sc. Ivana Generalić Mekinić | - predsjednik |
| 2. Izv. prof. dr. sc. Ana Maravić     | - član        |
| 3. Doc. dr. sc. Franko Burčul         | - mentor      |

**Datum obrane:** 29. listopada, 2019.

**Rad je u tiskanom i električnom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENT CARD

## DIPLOMA THESIS

**University of Split**

**Faculty of Chemistry and Technology Split**

**Graduate study of Chemistry; Course: Organic chemistry and biochemistry**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.

**Mentor:** Ph.D. Franko Burčul, assistant prof.; Ph.D. Ana Maravić, associate prof.

### ISOLATION, CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF STONE PINE, MARITIME PINE AND MARITIME JUNIPER ESSENTIAL OILS

Maša Jelavić Šako, 91

**Abstract:** Stone pine (*Pinus pinea* L.) and maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) are classified into the Pinaceae family. The selected species from the Cupressaceae family is maritime juniper (*Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa* Sibth. & Sm.). These evergreen species' habitat is in the Mediterranean and Sub-Mediterranean climate. The isolation of essential oils was carried out by the water distillation method in the Clevenger apparatus from the dried needles of the selected species. Subsequently, the essential oils were analyzed directly by coupled system gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Monoterpene  $\alpha$ -pinene was the most abundant compound in the essential oils of maritime pine and maritime juniper (28,52 % and 64,85 %, respectively), while in stone pine essential oil, monoterpene limonene was present in highest percentage (42,57 %). The antioxidant activity determined by the FRAP and DPPH methods showed that the isolated essential oils had low antioxidant activity. Furthermore, the ability to inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes was determined by the Ellman's method. At a maximum essential oil concentration of 22.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tested, maritime pine and maritime juniper oils showed the best results for inhibiting both enzymes. The acetylcholinesterase enzyme was inhibited with 94.08% and 78.03%; while butyrylcholinesterase was inhibited with 35.10% and 35.90%, respectively. Antimicrobial activity was also determined by the microdilution method. Essential oils did not show strong antibacterial activity, but have shown good antifungal activity. The essential oil of the maritime juniper stands out, with an MIC value below 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  against *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* and *S. pneumoniae*, and both types of fungi tested.

**Keywords:** pine, cypresses, essential oil, GC-MS, DPPH, FRAP, Ellman's method, antimicrobial activity

**Thesis contains:** 54 pages, 29 figures, 14 tables, and 36 references

**Original in:** Croatian

**Defence committe:**

- |  |                 |
|--|-----------------|
| 1. Ivana Generalić Mekinić, PhD, assistant prof. | – chair person  |
| 2. Ana Maravić, PhD, associate prof.             | – member        |
| 3. Franko Burčul, PhD, assistant prof.           | – member mentor |

**Defence date:** 29, October 2019.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđer Bošković 35.

*Diplomski rad je izrađen u zavodu za Analitičku kemiju, Kemijsko – tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula i komentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Maravić, Odjel za biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu od veljače do listopada 2019. godine.*

Rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.



*Iskreno se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Franku Burčulu, Vladimiru Jelaski-Relji i komentorici izv. prof. dr. sc. Ani Maravić, te izv. prof. dr. sc. Mirku Ruščiću.*

*Također se zahvaljujem svojoj obitelji, posebno Duji, i prijateljima na podršci.*

## **ZADATAK DIPLOMSKOG RADA**

- 1. Izolirati eterično ulje iglica pinja, primorskog bora i pukinje vodenom destilacijom po Clevengeru.*
- 2. Odrediti kemijski sastav dobivenog eteričnog ulja pomoću vezanog sustava GC-MS.*
- 3. Ispitati antioksidacijsku aktivnost eteričnog ulja DPPH i FRAP metodom.*
- 4. Ispitati sposobnost eteričnog ulja na inhibiciju acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze metodom po Ellmanu.*
- 5. Odrediti antimikrobnu aktivnost dobivenih eteričnih ulja.*

## SAŽETAK

Pinj (*Pinus pinea* L.) i primorski bor (*Pinus pinaster* Aiton) svrstavaju se u porodicu borovki (Pinaceae). Odabrana vrsta iz porodice čempresovki (Cupressaceae) je pukinja (*Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa* Sibth. & Sm.). Ovim zimzelenim vrstama stanište je u mediteranskoj i submediteranskoj klimi. Izolacija eteričnih ulja provedena je metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru iz osušenih iglica odabranih vrsta. Potom su eterična ulja izravno analizirana vezanim sustavom plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). U eteričnom ulju primorskog bora i pukinje, najzastupljeniji spoj je bio monoterpen  $\alpha$ -pinen (redom, 28,52 % i 64,85 %), dok je u eteričnom ulju pinja najzastupljeniji spoj je bio monoterpen limonen (42,57 %). Antioksidacijska aktivnost određena FRAP i DPPH metodama, pokazala je da izolirana eterična ulja imaju nisku antioksidacijsku aktivnost. Nadalje, sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze je određena metodom po Ellmanu. Pri najvećoj koncentraciji ulja od 22,72  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , za inhibiciju oba enzima najbolje rezultate su pokazala ulja primorskog bora i pukinje. Za enzim acetilkolinesterazu određena je inhibicija redom, 94,08% i 78,03%, a butirilkolinesteraze redom, 35,10 % i 35,90 %. Također je određena i antimikrobna aktivnost metodom mikrodilucije. Eterična ulja nisu pokazala jaku antibakterijsku aktivnost, ali zato su pokazala dobru antifungalnu aktivnost. Ističe se eterično ulje pukinje, s MIK vrijednošću ispod 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  protiv bakterija *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* i *S. pneumoniae* te obje vrste ispitanih gljivica.

**Ključne riječi:** borovi, čempresi, eterična ulja, GC-MS, DPPH, FRAP, metoda po Ellmanu, antimikrobna aktivnost

## SUMMARY

Stone pine (*Pinus pinea* L.) and maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) are classified into the Pinaceae family. The selected species from the Cupressaceae family is maritime juniper (*Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa* Sibth. & Sm.). These evergreen species' habitat is in the Mediterranean and Sub-Mediterranean climate. The isolation of essential oils was carried out by the water distillation method in the Clevenger apparatus from the dried needles of the selected species. Subsequently, the essential oils were analyzed directly by coupled system gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Monoterpene  $\alpha$ -pinene was the most abundant compound in the essential oils of maritime pine and maritime juniper (28,52 % and 64,85 %, respectively), while in stone pine essential oil, monoterpene limonene was present in highest percentage (42,57 %). The antioxidant activity determined by the FRAP and DPPH methods showed that the isolated essential oils had low antioxidant activity. Furthermore, the ability to inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes was determined by the Ellman's method. At a maximum essential oil concentration of 22.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tested, maritime pine and maritime juniper oils showed the best results for inhibiting both enzymes. The acetylcholinesterase enzyme was inhibited with 94.08% and 78.03%; while butyrylcholinesterase was inhibited with 35.10% and 35.90%, respectively. Antimicrobial activity was also determined by the microdilution method. Essential oils did not show strong antibacterial activity, but have shown good antifungal activity. The essential oil of the maritime juniper stands out, with an MIC value below 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  against *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* and *S. pneumoniae*, and both types of fungi tested.

**Keywords:** pine, cypresses, essential oil, GC-MS, DPPH, FRAP, Ellman's method, antimicrobial activity

# SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1 Porodica borovki (Pinaceae).....	2
1.1.1. Pinj ( <i>Pinus pinea</i> L.).....	2
1.1.2. Primorski bor ( <i>Pinus pinaster</i> Aiton) .....	3
1.2. Porodica čempresovki (Cupressaceae) .....	4
1.2.1. Pukinja ( <i>Juniperus oxycedrus</i> spp. <i>macrocarpa</i> ).....	4
1.3. Eterična ulja .....	5
1.3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja .....	5
1.4. Vrste izolacija eteričnog ulja .....	11
1.5. Kemijska analiza eteričnih ulja vezanim sustavom GC-MS.....	13
1.6. Oksidacijski stres, antioksidansi i radikali.....	14
1.6.1. Metode određivanja antioksidacijskih sposobnosti .....	16
1.6.2. Sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze .....	19
1.6.3. Sposobnost inhibicije butirilkolinesteraze .....	20
1.7. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja .....	21
1.7.1. Dilucijske metode (metode razrjeđivanja).....	21
1.7.2. Korišteni sojevi mikroorganizama .....	22
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	27
2.1. Priprema uzorka .....	27
2.2. Korišteni uređaji i kemikalije.....	27
2.3. Izolacija eteričnih ulja.....	28
2.4 GC-MS kemijska analiza eteričnog ulja .....	29
2.5. Metode bioloških ispitivanja.....	30
2.5.1. DPPH metoda.....	30
2.5.2. FRAP metoda.....	30
2.5.3. Ellmanova metoda .....	31
2.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti.....	34
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	36
3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja .....	36
3.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja iglica pinja ( <i>Pinus pinea</i> L.) .....	36

3.1.2. Kemijski sastav eteričnog ulja iglica primorskog bora ( <i>Pinus pinaster</i> Aiton).....	38
3.1.3. Kemijski sastav eteričnog ulja iglica pukinje ( <i>Juniperus oxycedrus</i> spp. <i>Macrocarpa</i> Sibth. & Sm.) .....	40
3.2. Antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom .....	42
3.3. Antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom.....	44
3.4. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze.....	44
3.5. Sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze.....	46
3.6. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja određena metodom mikrodilucije .....	47
4. ZAKLJUČAK.....	50
LITERATURA .....	52

## UVOD

Bor je uopćeni naziv za više vrsta četinara, zimzelene biljke koje rastu na području Mediterana. Pinj (*Pinus pinea* L.) i primorski bor (*Pinus pinaster* Aiton) svrstavaju se u porodicu borovki (Pinaceae), dok pukinja (*Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa* Sibth. & Sm.) pripada porodici čempresovki (Cupressaceae). Eterična ulja bora imaju antibakterijska, analgetska, diuretska i antiseptična svojstva, pa se stoga najčešće upotrebljava u liječenju bolesti respiratornog sustava, te u liječenju različitih kožnih bolesti.

Eterična ulja su smjese hlapivih, biološki aktivnih spojeva, dobivenih iz biljnog materijala postupkom destilacije ili tiještenjem (citrusi). Zbog ugodnog mirisa i različitih aktivnosti koriste se u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Ne uzimajući u obzir podjelu prema funkcijskim skupinama, komponente eteričnih ulja dijelimo na terpene, fenilpropanske derivate i ostale spojeve. 3-Izopentenil-pirofosfat je biogenetski prekursor svih terpena, čiji biogenetski put nastanka ide najčešće preko mevalonske kiseline.

Iz osušenih iglica odabranih borova, eterična ulja su dobivena vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru. Nakon izolacije kemijski sastav je izravno analiziran vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije mase (GC-MS). Antioksidacijska aktivnost je ispitana pomoću DPPH (radikalni mehanizam), i FRAP (redoks mehanizam) metode. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze određena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu, dok je antimikrobna aktivnost određena metodom mikrodilucije.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1 Porodica borovki (Pinaceae)

Borovke (Pinaceae) se svrstavaju u biljni razred četinjača. Porodica pretežno zimzelenih, igličastih drveća i grmlja dijeli se na četiri potporodice, te jedanaest rodova s oko 230 vrsta<sup>1</sup>

**Tablica 1.** Sistematika porodice borovki (Pinaceae)<sup>1</sup>

<b>Carstvo</b>	Plantae
<b>Divizija</b>	Pinophyta
<b>Razred</b>	Pinopsida
<b>Red</b>	Pinales
<b>Porodica</b>	Pinaceae

### 1.1.1. Pinj (*Pinus pinea* L.)

Pinj je crnogorično stablo iz porodice borovki. Stablo naraste do 25 metara visine. Većina debla nema grane, početne su horizontalne i duge, a vršne rastu uspravno, tako da cijelo stablo podsjeća na kišobran. Igljice su svjetlo-zelene, dugačke oko 10 do 20 centimetara, te se nalaze u paru. Jednospolni cvijetovi cvatu u travnju i svibnju. Češeri su im okrugli, krupni, sjedeći. Njihove sjemenke su jestive, nazivaju se pinjolima, i samo ime vrste *pinea* dobila je ime po njima.

Rasprostranjen je na području cijelog Mediterana, kod nas je introducirana vrsta, dok se na području Mljeta smatra autohtonom. Životni vijek im je do oko 250 godina, ne podnose sušna razdoblja, buru, ni temperature niže od - 10 °C (Slika 1.).<sup>2</sup>



**Slika 1.** Pinj<sup>3</sup>



### 1.1.2. Primorski bor (*Pinus pinaster* Aiton)

Primorski bor pripada porodici borovki. Može narasti do 35 metara visine, tako da tvori piramidalnu, prozračnu krošnju. Plavkasto-zelene iglice su dugačke od 10 do 25 centimetara, nalaze se u paru ili po tri u čuperku. Češeri su svjetlo-smeđi, jajasti, nalaze se u grupama od dva do četiri. Prirodno je rasprostranjen na području Sredozemlja, dok je u Južnoj Africi invazivna vrsta. Uzgaja se zbog proizvodnje smole. Ne podnosi sušna razdoblja, ni niske temperature (Slika 2.).<sup>6</sup>



**Slika 2.** Primorski bor<sup>5</sup>

## 1.2. Porodica čempresovki (Cupressaceae)

Prije se porodica čempresovki kvalificirala vlastitim redom čempresolika, dok se sad kvalificira redom borolika. Porodici pripada 30 priznatih rodova, te 160 priznatih vrsta.<sup>6</sup>

**Tablica 2.** Sistematika porodice čempresovki<sup>6</sup>

Carstvo	Plantae
Divizija	Tracheophyta
Razred	Pinopsida
Red	Pinales
Porodica	Cupressaceae

### 1.2.1. Pukinja (*Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa*)

Pukinja (*Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa* Sibth. & Sm.) je zimzeleni grm iz porodice čempresovki (Cupressaceae). Može narasti do 5 metara u visinu, a krošnja mu je okruglasta. Listovi su iglice duge 1,2 do 2 centimetra. Plodovi su češeri, crvenkasto-smeđi ili tamno sive boje, oblika bobice, koji na vrhu imaju trokraku brazdu.



**Slika 3.** Grana pukinje<sup>7</sup>

Stanište joj je mediteranska i submediteranska klima. Raste na kamenjarima, pogoduju joj sunčana i sušna staništa, te podnosi prisolicu, ali ne i niske temperature.<sup>8</sup>

### 1.3. Eterična ulja

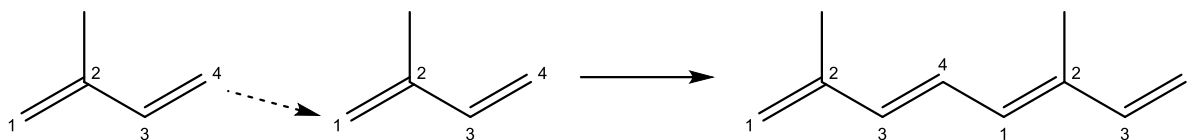
Eterična ulja su složene smjese isparljivih spojeva intenzivnog mirisa. Topljiva su u lipofilnim otapalima, u vodi su teško topljiva, a pri sobnoj temperaturi su u pravilu tekuća i lakša od vode (specifične težine od 0,84 do 0,88). Temperatura vrenja im je od 150 °C do 300 °C, te su optički aktivna. Dobivaju se fizikalnim metodama izolacije, destilacijom iz aromatičnog bilja ili tiještenjem iz kore arguma. Sa stajališta biljne fiziologije, eterična ulja su sekundarni metaboliti koji nastaju u biljnoj protoplazmi kao produkt disimilacijske izmjene tvari, vjerojatno primarno u plastidima. Maseni udio eteričnog ulja u aromatičnim biljkama iznosi najmanje 0,1 %, najčešće je između 1 i 2 %, ali njegov udio može biti čak i do 20 % (klinčić, ylang ylang). Eterično ulje može biti pohranjeno u različitim biljnim organima, a njegov kemijski sastav se mijenja sa vanjskim i unutarnjim čimbenicima (klimatske promjene, edafski čimbenici, razvojni stadij biljke, način izolacije i sušenja, itd.). I dalje je nepoznata fiziološka uloga eteričnog ulja u biljkama, ali se smatra da sudjeluje u biljnim interakcijama (npr. inhibicija pupanja, štiti biljku od hladnoće, sušnih razdoblja, djeluje antibakterijski) i interakcijama između biljaka i životinja (štiti biljku od predatora i patogena, ali i privlači oprašujuće vrste).<sup>9</sup>

#### 1.3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Po kemijskom sastavu eterična ulja su više ili manje složene smjese aromatičnih, alifatskih, cikličkih, acikličkih, zasićenih i nezasićenih prirodnih organskih spojeva. Ne uzimajući u obzir funkcijske skupine, komponente eteričnih ulja se mogu podijeliti prema građi ugljikovog kostura u tri glavne skupine na terpene (izoprenoide), fenilpropanske derivate i ostale spojeve.

##### 1.3.1.1. Terpeni

Njemački kemičar i nobelovac, Otto Wallach, je počeo destilirati ulja, i izolirane mirisne tvari nazvao je terpenima. Ustanovio je da su svi terpeni sastavljeni od izoprenskih jedinica, 2-metilbuta-1,3-dien, tj. kraće C5-jedinica, nakon čega je predložio izoprensko pravilo koje pretpostavlja građu pravilnih terpena tako da su izoprenske jedinice povezane načinom "glava na rep", odnosno glava tj. razgranati završetak jedne C5-jedinice je povezan na rep, tj. nerazgranati završetak, druge jedinice.<sup>9</sup>

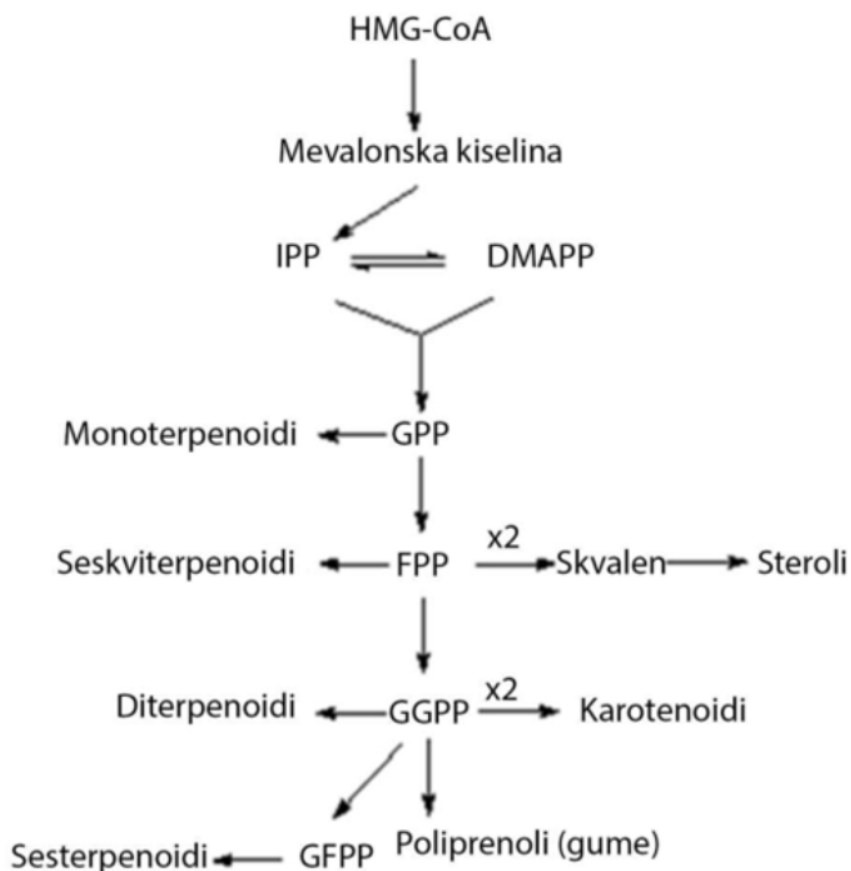


**Slika 4.** Izoprensko pravilo

Lavoslav Ružička je jedan od najpoznatijih hrvatskih kemičara 20. stoljeća koji je Wallachovo izoprensko pravilo iskoristio kao smjernice da zaključi strukture velikog raspona terpena. Osim što je utvrdio strukturnu jedinicu zajedničku svim terpenima, ustanovio je također da se raspored skupina od pet ugljikovih atoma nađenih unutar svakog spoja može povezati strukturom molekule izoprena.<sup>10</sup>

Uz pravilne terpene postoje i oni nepravilni, gdje se izoprenske jedinice povezuju na druge načine, npr. "glava na glavu" ili "glava na sredinu".

Biljke ne mogu sintetizirati terpene iz izoprena, nego iz njegovog biosintetskog ishodnog spoja izopentenil-pirofosfata preko mevalonske kiseline ili deoksisiluloza-5-fosfata.<sup>6</sup> Mevalonska kiselina se fosforilizira, nastali pirofosfat se dekarboksilizira i otcjepljuje mu se fosfatni ostatak, te tako prelazi u izopentenil-pirofosfat (IPP). IPP djelovanjem enzima izomeraze prelazi u dimetilalil-pirofosfat (DMAPP). DMAPP se kondenzira sa sljedećom molekulom IPP i nastaje geranil-pirofosfat (GPP, C<sub>10</sub>), koji je ujedno i ključni intermedijer u biosintezi monoterpena i seskviterpena. GPP kondenzacijom sa molekulom IPP-a formira farnezil-pirofosfat (FPP, C<sub>15</sub>), prekursor u biosintezi seskviterpena. Nadalje, polimerizacijom FPP-a nastaje geranilgeranil-pirofosfat (GGPP, C<sub>20</sub>), prekursor diterpena.<sup>11</sup>



**Slika 5.** Sinteza terpena (GPP - geranil-pirofosfat, FPP - farnezil-pirofosfat, GGPP - geranilgeranil-pirofosfat, GFPP - geranilfarnezil-pirofosfat)<sup>11</sup>

Terpeni koji ulaze u sastav eteričnog ulja (temperatura vrelišta ispod 250 °C) dijele se na semiterpene, monoterpene, seskviterpene i diterpene i dr. Semiterpeni su građeni od jedne izoprenske jedinice (5 ugljikovih atoma), monoterpeni od dvije izoprenske jedinice (10 ugljikovih atoma), seskviterpeni od tri izoprenske jedinice (15 ugljikovih atoma), a diterpeni od 4 izoprenske jedinice (20 ugljikovih atoma).

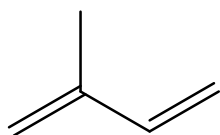
Također terpeni možemo podjeliti na cikličke i acikličke, a prema funkcijskim skupinama mogu biti terpeni ugljikovodici, alkoholi, ketoni, kiseline, fenoli, eteri, esteri itd.<sup>9</sup>

**Tablica 3.** Prekursori terpena i njihova podjela prema broju C<sub>5</sub> jedinica

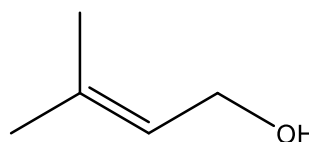
NAZIV	BROJ C <sub>5</sub> JEDINICA	PREKURSOR
monoterpeni	2	GPP
seskviterpeni	3	FPP
diterpeni	4	GGPP
sesterpeni	5	GFPP
triterpeni	6	skvalen
tetraterpeni	8	fitoen
Poliprenoli, gume	n	GGPP+(C <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>

GPP- geranil-pirofosfat, FPP- farnezil-pirofosfat, GGPP- geranil-geranil-pirofosfat, GFPP- geranil-farnezil-pirofosfat.

Semiterpeni su najjednostavniji terpeni izgrađeni od jedne C<sub>5</sub> jedinice. Izopren, semiterpen, je ujedno i osnovna jedinica svih terpena. Semiterpeni su izgrađeni od 2-metil-1,3-butandiena (izopren) i 3-metil-2-buten-1-ola (prenol).



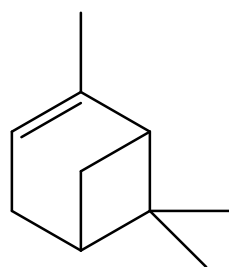
**Slika 6.** Izopren



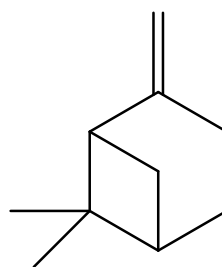
**Slika 7.** Prenol

Zbog svoje male molekulske mase su isparljivi, pa su mogući značajni gubici tijekom obrade biljnih uzoraka i izolacije eteričnog ulja.<sup>9,10</sup>

Monoterpeni su izgrađeni od dvije C<sub>5</sub> jedinice i glavni su sastojci eteričnih ulja ljekovitih biljaka i začina gdje čine do 5 % težine suhog biljnog materijala. Dijele se na hlapljive i nehlapljive. Hlapljivi su sastojci eteričnih ulja, a nehlapljivi su sekoiridoidi i iridoidi. Također se mogu podijeliti na pravilne i nepravilne monoterpe. Pravilne dijelimo na acikličke, monocikličke, bicikličke i tricikličke. Aciklički monoterpeni su povezani na način glava-rep, a najznačajniji predstavnici su linalool,  $\beta$ -mircen, citronelol i geraniol. Monociklički monoterpeni su pretežno izvedeni iz *p*-metilizopropilcikloheksana, a osnovni predstavnici su limonen, mentol, karvon i terpineol. Biciklički monoterpeni imaju primarni šesteročlani prsten, a po sekundarnom prstenu se dijele u tri grupe. Prva grupa kao sekundarni prsten ima tročlani prsten, i njegovi predstavnici su tujon i karan. Druga grupa kao sekundarni prsten ima četveročlani prsten, i njegovi predstavnici su pinani,  $\alpha$ -pinen i  $\beta$ -pinen. U trećoj grupi je sekundarni prsten peteročlani prsten, i predstavnik je kamfan.<sup>10</sup>



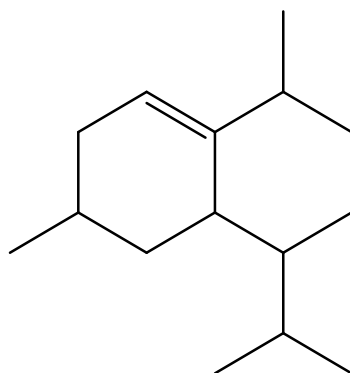
**Slika 8.**  $\alpha$ -pinen



**Slika 9.**  $\beta$ -pinen

Pineni sami po sebi nisu biološki aktivni jer su građeni samo od atoma vodika i kisika. Vrlo su lipofilne molekule, pa svoj mehanizam djelovanja vjerojatno duguju interakciji sa lipidnim strukturama stanica, poput membrana. Pri toj interakciji nastaju njihovi derivati sa kisikom, najčešće alkoholi, koji djeluju kao bronhodilatatori, antimikrobne i protuupalne tvari. Antimikrobni mehanizam djelovanja se temelji na djelovanju na membrane bakterija i gljivica, dok je bronhodilatacijski mehanizam objašnjen djelovanjem na kalcijeve kanale, zbog čega dolazi do relaksacije glatkog mišića bronha.<sup>13</sup>

Seskviterpeni su građeni od tri  $C_5$  jedinice i oni se nalaze u višim frakcijama eteričnih ulja. Većina seskviterpena djeluju kao fitoaleksini, tj. antibiotski spojevi koje biljke proizvode za obranu od mikroorganizama. Dobivaju se metodama ciklizacije iz zajedničkog prekursora farnesil-pirofosfata. Dijelimo ih na acikličke, monocikličke i bicikličke seskviterpene. Najvažniji predstavnici acikličkih seskviterpena su farnesen i farnesol, monocikličkih su bisabolen i zinziberen, a bicikličkih je kadinen.<sup>10</sup>

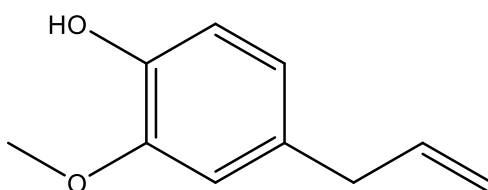


**Slika 10.** Kadinen

Diterpeni su terpeni izgrađeni od četiri  $C_5$  jedinice, izvedeni iz geranilgeranil-pirofosfata. Postoji vrlo mali broj hlapivih diterpena koji se nalaze u eteričnim uljima.

### 1.3.1.2. Fenilpropanski derivati

Fenilpropanski derivati su prirodni spojevi koji sadrže fenilni prsten sa jednim pobočnim propanskim lancem. Izvode se iz cimetne kiseline, a mogu biti aldehidi, fenoli i fenileteri. Također postoji grupa spojeva sa skraćenim ili eliminiranim pobočnim lancem, poput fenilkarboksilne kiseline, jednostavnih fenola i kumarina. Najpoznatiji primjer je eugenol, derivat fenil propanoida. Eugenol je žuta, masna tekućina lako topljiva u organskim otapalima.<sup>9,12</sup>



**Slika 11.** Eugenol

### 1.3.1.3. Ostali spojevi

Grupi pripadaju lančasti ugljikovodici (*n*-heptan) i njihovi derivati sa kisikom, te u manjoj količini derivati sa dušikom i sumporom.<sup>9</sup>

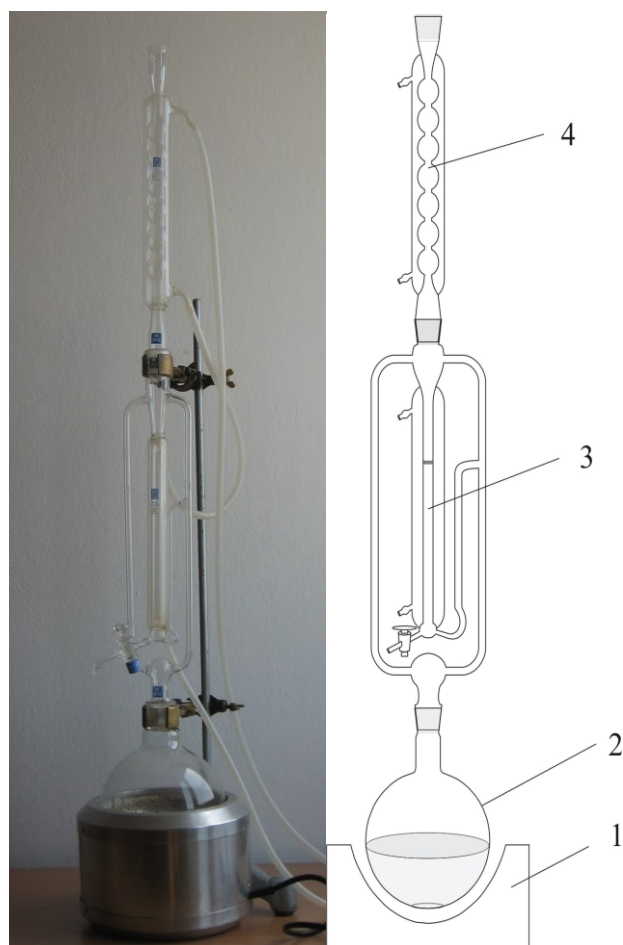


#### 1.4. Vrste izolacija eteričnog ulja

Destilacija je postupak kod kojeg se tekućina zagrijava i prevodi u paru, a zatim nastala para se odvodi i hlađenjem kondenzira. Za izolaciju eteričnog ulja iz biljnog materijala koriste se tri tipa destilacije, i to destilacija vodom, vodenom parom, te direktna destilacija parom.

Glavna karakteristika postupka destilacije vodom je direktan kontakt između kipuće vode i biljnog materijala, jer se materijal potpuno uranja u vodu koja se zagrijava. Kako je voda u većem omjeru od biljnog materijala, svi dijelovi biljke su u kontaktu s vodom te se zbog vrenja vode miješaju. Velika prednost ove metode u odnosu na ostale metode je ta što destilat ne sadrži neisparljive tvari koje kasnije mogu interferirati. Ovaj postupak se koristi za izolaciju tvari visokog vrelišta, iznad 200 °C. Glavni nedostatak je nemogućnost izvođenja potpune ekstrakcije eteričnog ulja, tj. malo iskorištenje. Također vodenom destilacijom nastaju i artefakti, spojevi koji nisu sami od sebe prisutni u eteričnom ulju. Na primjer, određeni esteri se djelomično hidroliziraju, ili aldehidi imaju tendenciju da se polimeriziraju. Zbog ovih razloga, destilacija vodom se koristi samo kada se druge metode destilacije ne mogu koristiti.<sup>14</sup>

U ovom radu je korištena metoda vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru. Voda i biljni materijal se zagrijavaju u tikvici pomoću kalote do točke vrenja, kada počinje isparavanje. Vodena para, zajedno sa eteričnim uljem se izdiže, te prolazi kroz cijevi aparature, dok ne dođe do hladila gdje se kondenziraju. U radijalnom dijelu cijevi se na osnovi specifične mase razdvajaju destilat, eterično ulje, i hidrolat, voda u kojoj se nalaze otopljene bioaktivne tvari.<sup>15</sup>



Slika 12. Shema aparature po Clevengeru: 1) kalota, 2) tikvica s okruglim dnom, 3) aparat po Clevengeru, 4) hladilo po Allihnu. <sup>16</sup>

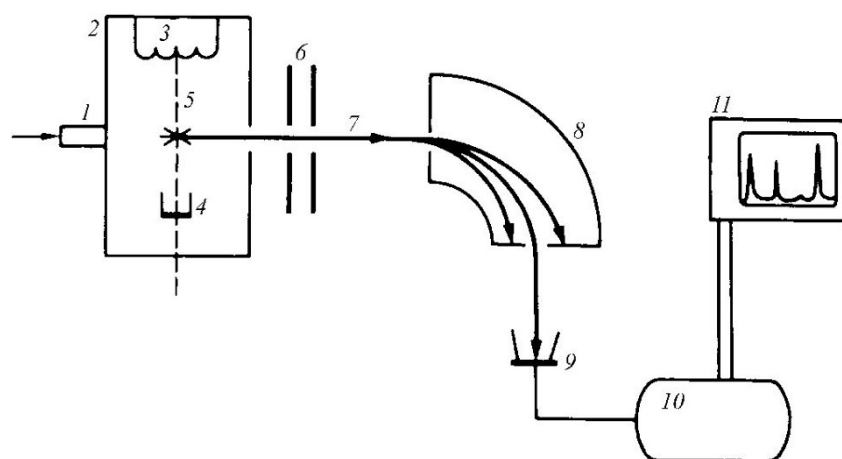
Druga metoda je destilacija vodenom parom, koja se primjenjuje kod destilacije biljnog materijala bogatog eteričnim uljem koje sadrži termostabilne komponente netopive u vodi. Vodena para se propušta kroz biljni materijal, potom eterično ulje zajedno sa parom kondenzira, skuplja se i na kraju dekantira. Glavne prednosti ovog postupka su veće iskorištenje eteričnog ulja, manje artefakata, te veća brzina od one kod vodene destilacije.

Direktna destilacija parom je proces kod kojeg biljni materijal direktno destiliramo vodenom parom. Biljni materijal se pri tome ne zagrijava na temperaturu višu od 100 °C, pa ne dolazi do toplinske degradacije sastojaka. Zbog toga je ova metoda destilacije najprihvaćeniji postupak za proizvodnju eteričnih ulja, ali zahtjeva više kapitalnih izdataka od ostalih dviju metoda.<sup>14</sup>

## 1.5. Kemijska analiza eteričnih ulja vezanim sustavom GC-MS

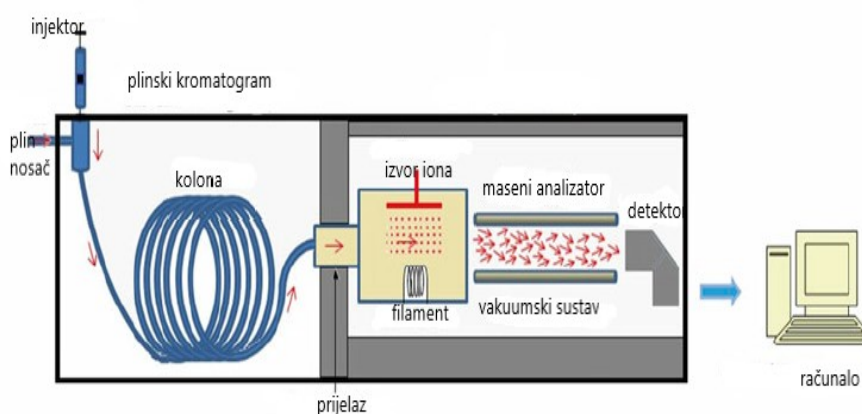
Najčešća korištena tehnika odjeljivanja smjesa isparljivih spojeva je plinska kromatografija (GC) kod koje je mobilna faza u plinovitom stanju, dok stacionarna faza može biti tekuća ili čvrsta. Kao mobilnu fazu, tj. plin nosač, najčešće se koriste plinovi helij, vodik, ili dušik. Uzorak se prije uvođenja u kolonu prevodi u plinovito stanje, zatim nošen plinom nosačem, prolazi kroz kromatografsku kolonu pri čemu se vrši odjeljivanje. Na izlazu iz kolone se nalazi detektor koji registrira prisutnost spoja u uzorku, automatski ih bilježi u vidu kromatograma.<sup>12</sup>

Masena spektrometrija (MS) je instrumentalna analitička tehnika kojom se određuje relativna molekulska masa i količina iona nastalih ionizacijom molekula, pri čemu se ioni razdvajaju temeljem omjera njihove mase i naboja. Maseni spektrometar je uređaj koji radi pod vakuumom, te ima četiri osnovna dijela. Prvi dio je sustav za unošenje uzorka. Potom imamo ionski izvor koji stvara ione bombardiranjem molekula elektronima, te ih u električnom polju ubrzava. Analizator, koji je najčešće magnetsko polje, savija putanje različitih iona te ih tako razlikuje ovisno o omjeru njihove mase i naboja ( $m/z$ ). Na kraju se nalazi detektor koji razdvojene ione sakuplja i karakterizira. Mijenjanjem jakosti magnetskog polja mogu se registrirati ioni različitih omjera mase i naboja te tako nastaje maseni spektar specifičan za određeni kemijski spoj.<sup>17</sup>



**Slika 13.** Maseni spektrometar s magnetskim analizatorom - 1. sustav za unošenje uzorka; 2. ionski izvor; 3. katoda; 4. anoda; 5. elektronski snop; 6. električno polje; 7. ionski snop; 8. magnetsko polje; 9. detektor; 10. elektronička obradba signala; 11. zapis spektra<sup>12</sup>

Kombinacija ovih dviju tehnika, vezani sustav GC-MS, omogućava dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine materijala. Plinska kromatografija omogućava vrlo efikasno odjeljivanje komponenata iz složenih smjesa organskih spojeva, dok je maseni spektrometar izuzetno specifičan, osjetljiv i brz kod detekcije i identifikacije spojeva. Osnovni dijelovi GC-MS sustava su kromatograf, maseni spektrometar i prijelaz koji povezuje oba instrumenta.<sup>12</sup>



**Slika 14.** Vezani sustav GC-MS<sup>12</sup>

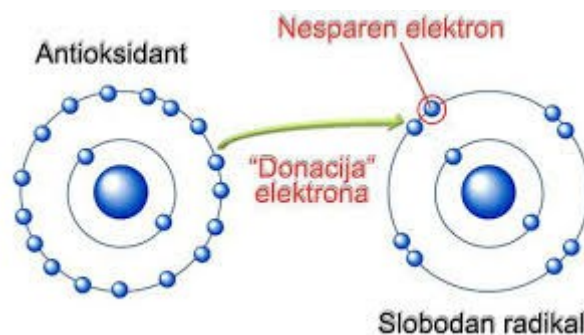
## 1.6. Oksidacijski stres, antioksidansi i radikali

Oksidacijski stres je pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama koje idu u smjeru oksidacije pri čemu dolazi do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala. Na ovaj način se remeti ravnoteža stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti stanice da ih ragrađi, pa dolazi do oštećenja stanice na način da se mijenja struktura i funkcija brojnih biomolekula, polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina, narušava se homeostaza iona, prijenos signala u stanici i genska transkripcija.

Slobodni radikal je kemijska vrsta koja u svojoj vanjskoj ljusci posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona, te je sposobna za samostalan život. Zbog težnje da postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju, tj. da spare nespareni elektron, slobodni radikali su vrlo reaktivni. Biokemijski su najznačajniji reaktivni oblici kisika i dušika. Reaktivni oblici kisika su radikali kisika (superoksidni, hidroksilni, peroksidni itd.) i reaktivni neradikalni derivati

kisika (vodikov peroksid, hipokloritna kiselina, singletni kisik itd.). Reaktivni oblici dušika mogu biti slobodni radikali dušika (dušikov(II) oksid, dušikov(IV) oksid) i neki drugi spojevi poput peroksinitrita, nitrozilnog kationa itd. Proces nastanka radikala u stanicama se događa kontinuirano, jer je vezan uz normalne metaboličke reakcije, poput respiracijskog lanca u mitohondrijima ili autooksidacijskih reakcija.

Antioksidansi su raznovrsna skupina molekula koje u još vrlo niskim koncentracijama u odnosu na koncentraciju oksidativnog supstrata, značajno sprječavaju njegovu oksidaciju. Mogu nastati u stanici ili se unijeti u organizam putem hrane i vitaminskih suplemenata. Djelovanje im je takvo da onemogućuju stvaranje ili neutraliziraju već stvorene radikale u organizmu. Najjednostavnija podjela antioksidansa je na antioksidacijske enzime, koji nastaju u stanicama, i male molekule antioksidansa. Antioksidacijski enzimi razgrađuju manje aktivne oblike kisikovih radikala u nenabijene neaktivne molekule i obnavljaju oštećene molekule DNA i proteina. Druga skupina antioksidansa čine brojne molekule koje pretvaraju vrlo aktivne slobodne radikale u zasićene molekule, koje samim tim postaju “čistači” slobodnih radikala.<sup>19</sup>

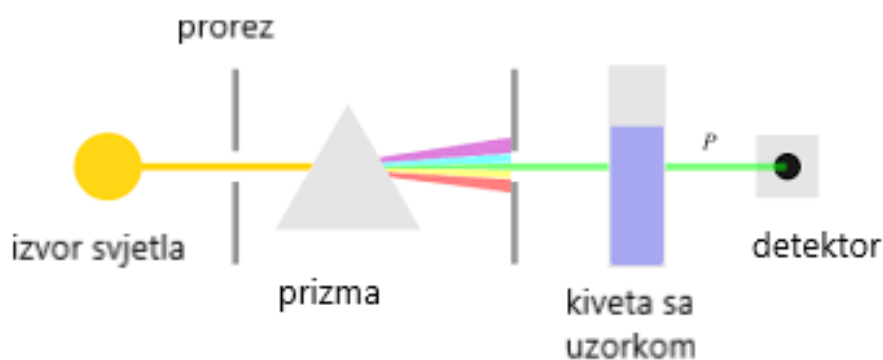


Slika 15. Djelovanje antioksidansa na slobodni radikal<sup>20</sup>

### 1.6.1. Metode određivanja antioksidacijskih sposobnosti

Najčešće primjenjivana tehnika za određivanje antioksidacijske sposobnosti je ultraljubičasta “UV” i vidljiva apsorpcijska “Vis” spektroskopija. Spektrofotometrija se temelji na apsorpciji UV i/ili Vis zračenja u organskim molekulama, pri čemu dolazi do prijelaza iz osnovnog u pobuđeno energetske stanje elektrona, koje rezultira pojavom odgovarajućih spektara. Na valnu duljinu pri kojoj će molekula apsorbirati energiju utječe jakost kojom su vezani njezini elektroni. Važno je da li su u molekuli prisutni kromofori i auksokromi. Kromofori su spojevi sa nezasićenom funkcijskom skupinom, npr. karbonilna skupina, koja ima karakterističnu optičku apsorpciju na određenim valnim duljinama. Auksokromi imaju jedan ili više nesparenih elektronskih parova, npr. hidroksilna ili amino skupina, koji sami ne apsorbiraju energiju, ali mijenjaju apsorpcijska svojstva kromofora.

Uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja zove se spektrofotometar. Najbitniji dijelovi spektrofotometra su izvor svjetlosti, monokromator, kivete i njihovi držači, te uređaj za mjerenje inteziteta propuštene svjetlosti. Kao izvor svjetlosti za vidljivi dio svjetla najčešće se koristi volframova žarulja, a za ultraljubičasti dio deuterijeva lampa. Monokromator pretvara polikromatsko svjetlo u monokromatsko točno određene valne duljine. Za Vis područje se koristi staklena prizma, za UV-Vis kvarna prizma ili optička mrežica. Za Vis dio spektra kivete su staklene, a za UV kvarne, kako staklo ne propušta UV zračenje. Spektrofotometar, kojeg smo mi koristili, ima dvije zrake. Jedna zraka prolazi kroz kivetu s uzorkom, a druga kroz referentnu kivetu napunjenu destiliranom vodom. Detektor uspoređuje intezitet svjetlosti zraka i šalje ih u pretvarač, program na računalu. Apsorbancija ( $A$ ) je logaritam omjera inteziteta ulazne i izlazne zrake koji govori koliko je svjetla apsorbirano u uzorku pri određenoj valnoj duljini. Linearni odnos apsorbancije i koncentracije se zove umjerna krivulja, tj. “baždarni ili kalibracijski dijagram.”<sup>21</sup>

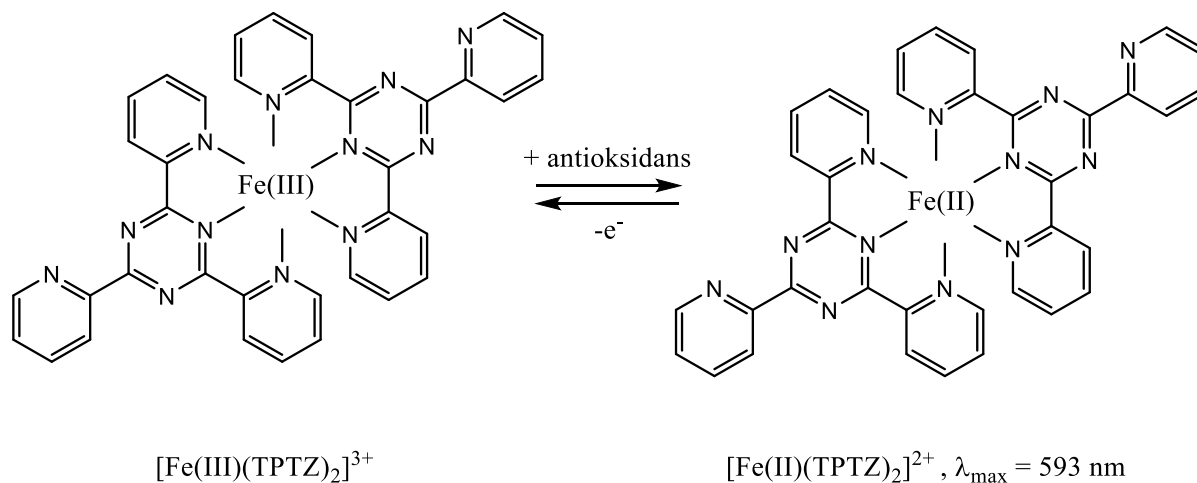


## Slika 16. Princip rada spektrofotometra<sup>22</sup>

Metode koje mjere antioksidacijski kapacitet temelje se na različitim mehanizmima obrambenog sustava antioksidanasa, poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala ili kelatiranja metalnih iona, koji dovode do nastajanja slobodnih radikala. Postoje direktne i indirektne metode određivanja. U direktne spadaju ORAC metoda i određivanje antioksidacijskog kapaciteta metodom s  $\beta$ -karotenom, dok su indirektne metode DPPH, TEAC/ABTS<sup>+</sup> i FRAP.<sup>21</sup>

### 1.6.1.1. FRAP metoda

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ), pri čemu se, ako dolazi do reakcije, otopina oboji u plavu boju. Kako bi se zadržala dobra topljivost željeza reakcija se odvija u kiselom mediju pri pH=3,6 kako bio ionizacijski potencijal i redoks potencijal omogućili pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> iznosi 0,77 V. Spojevi sa nižim redoks potencijalom ulaze u reakciju redukcije željeza, te tako doprinose konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta.

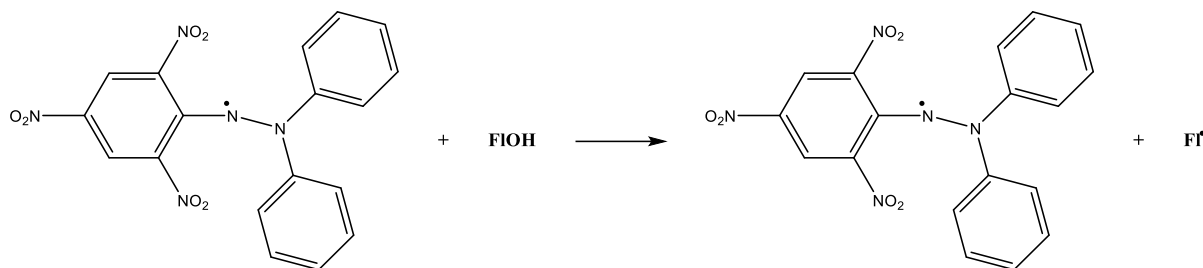


Slika 17. Reakcija redukcije željezo-2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ)

Redukcija Fe(III)-TPTZ kompleksa, koji je žuto obojen, se prati porastom apsorbancije pri  $\lambda = 593 \text{ nm}$  u njegov reducirani Fe(II)-oblik, plavo obojen, u prisutnosti antioksidansa.<sup>21</sup>

### 1.6.1.2. DPPH metoda

DPPH metoda se temelji na sposobnosti gašenja molekula slobodnih radikala. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH $\cdot$ ) je stabilni slobodni radikal koji ima nespareni elektron na jednom atomu dušikova mosta zbog čega intenzivno apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517 nm.



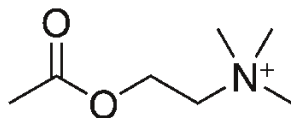
**Slika 18.** Reakcija DPPH radikala s flavonoidima<sup>21</sup>

Antioksidans, na slici je to flavonoid, donira vodik dušiku koji sadrži jedan nespareni elektron. DPPH je stabilni radikal, jer mu je elektron delokaliziran preko cijele molekule, pa neće dimerizirati kao ostali slobodni radikali. Delokalizacija uzrokuje ljubičastu boju s apsorbancijom na 517 nm u otopini etanola. Kada antioksidans donira DPPH radikalumu vodik, dolazi do gubitka ljubičaste boje otopine. Reakcijom nastaju DPPHH i radikal antioksidansa. Postotak neutralizacije slobodnih radikala u otopini je proporcionalan smanjenju apsorbancije mjerene otopine uzorka i DPPH.<sup>21,23</sup>



## 1.6.2. Sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze

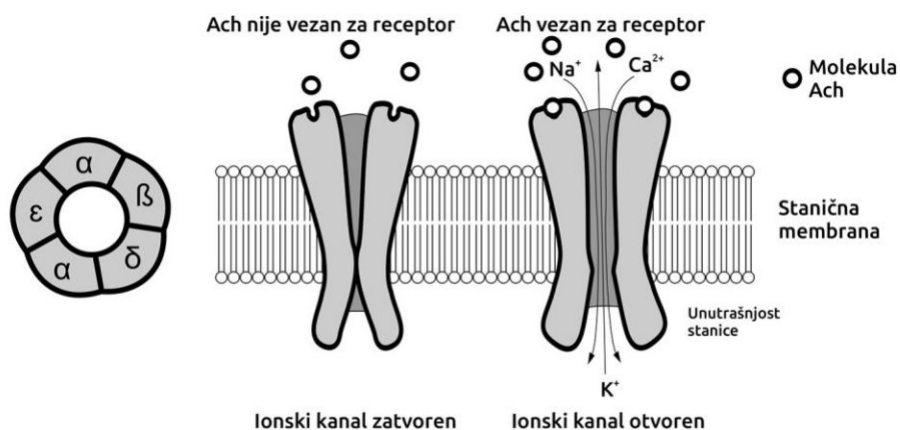
Acetilkinolin (ACh) je prvi otkriveni i najzastupljeniji neurotransmiter, koji za razliku od ostalih neurotransmitera, nije aminokiselina, niti je izgrađen od aminokiselina.



Slika 19. Acetilkinolin

Izlučuje ga parasimpatički živac vagus na živčanim krajevima. Acetilkinolin se sintetizira pomoću enzima kolin-acetiltransferaze iz acetyl-CoA i kolina. Postoje dva tipa receptora za acetilkolin, nikotinski i muskarinski. Acetilkinolin se ne uklanja difuzijom iz sinaptičke pukotine, nego razgradnjom. Hidrolitički enzim acetilkolinesteraza njegovom hidrolizom kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava.

Proces se odvija tako što dolazak živčanog impulsa uzrokuje ispuštanje acetilkolina iz sinaptičkog mjehurića pre-sinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu. Tu se veže na receptore, nikotinski i muskarinski, koji su vezani ili na postsinaptičku membranu kolinergičke sinapse ili na mišićne stanice. Kada se veže acetilkolin dolazi do depolarizacije membrane, što uzrokuje prijenos signala, odnosno živčanog impulsa. Zatim njegovom razgradnjom se ponovno uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane i prijenos živčanog impulsa prestaje.



Slika 20. ACh i receptori<sup>24</sup>

Acetilkolinesteraza pripada skupini serinskih esteraza. Nalazi se u sinapsama, u živčanim i glija stanicama ljudskog mozga, u mišićima, te u krvi gdje je vezana na eritrocite. Inhibitori acetilkolinesteraze, njezinom inhibicijom, povećavaju koncentraciju acetilkolina u sinaptičkoj pukotini. Inhibitori mogu biti reverzibilni, primjena im je terapijska, i ireverzibilni, koriste se kao otrovi. Povećanje kolinergičke transmisije u predjelima frontalnog korteksa kompenzira se gubitak funkcionalnih stanica mozga. Inhibitori AChE se koriste za simptomatsko liječenje Alzheimerove bolesti.<sup>25,26</sup>

Alzheimerova bolest je teška, neizlječiva, degenerativna bolest mozga, koja uzrokuje smrt. Kako bolest uznapreduje dolazi do demencije, gubitka pamćenja, poremećaja mišljenja, te promjena u ponašanju i osobnosti bolesnika. Dvostruko češće pogađa žene nego muškarce, uglavnom u dobi iza 65 godina. Najčešće bolest traje oko 7 godina, ali može potrajati i do 20 godina. Ljudi pogođeni Alzheimerovom bolesti imaju oštećenja bazalne jezgre, koja se nalazi u moždanom deblu i proizvodi acetilkolin.<sup>19</sup>

### **1.6.3. Sposobnost inhibicije butirilkolinesteraze**

Butirilkolinesteraza (BchE) je prisutna u središnjem i perifernom živčanom sustavu, u cerebrospinalnoj tekućini, u crijevima, plućima, gušterači i jetri. Dokazano je da hidrolizira acetilkolin u sinapsi, ali njezin specifični fiziološki supstrat nije pronađen, pa joj nije razjašnjena fiziološka uloga. Utvrđeno je da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina, te u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva. Također joj je pojačana ekspresija kod neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimerova bolest. Sudjeluje i u biokonverziji nekoliko farmakološki važnih spojeva. Neke aktivira, poput bambuterola i heroina, a neke deaktivira poput sukcinildikolina, aspirina, kokaina, amitriptilina.<sup>28</sup>

## 1.7. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja

Sintetički antibiotici su od svog otkrića u 20 stoljeću značajno utjecali na smanjenje rizika od nastanka zaraznih bolesti, ali sa povećanjem učestalosti njihove primjene brojne bakterije su stekle svojstvo rezistentnosti. Zbog toga je neophodno razviti novi način zaštite ljudi i životinja od bakterijskih infekcija. Za veliki broj eteričnih ulja je poznato da posjeduju antimikrobna svojstva. Antimikrobna aktivnost se razlikuje od ulja do ulja, mogu djelomično do potpuno inhibirati rast bakterija, tj. imaju bakteriostatsku ili baktericidnu aktivnost.

Važna karakteristika eteričnih ulja je hidrofobnost. Hidrofobnost povećava permeabilnost stanične membrane bakterije i omogućava lakši prolazak komponenata eteričnog ulja kroz njen lipidni sloj. Kako se promjeni permeabilnost stanične membrane, bakterija gubi osmotsku kontrolu stanice, što se smatra glavnim načinom antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja. Mnogi spojevi eteričnih ulja reagiraju sa proteinima stanične membrane. Ciklički ugljikovodici reagiraju sa adenzin-trifosfatazom, enzimom smještenim na staničnoj membrani okruženim molekulama lipida. Također ugljikovodici mogu utjecati na distorziju proteina u lipidnoj membrani, što dovodi do direktne interakcije lipofilne komponente sa hidrofobnim dijelom proteina. Najveću inhibitornu aktivnost na rast bakterija imaju fenoli i alkoholi, zatim aldehidi i ketoni, pa ugljikovodični monoterpeni koji imaju malu inhibitornu aktivnost.

Metode koje se koriste za ispitivanje antimikrobne aktivnosti možemo podijeliti na difuzijske, dilucijske i bioautografske metode.<sup>29</sup>

### 1.7.1. Dilucijske metode (metode razrjeđivanja)

Metode razrjeđivanja podrazumijevaju pripremanje dvostrukih razrijeđenja nekog uzorka, u ovom slučaju eteričnog ulja, kojem se određuje antimikrobna aktivnost, u epruvetama s tekućim hranjivim medijom. Epruvete se nasiju standardnom bakterijskom suspenzijom i inkubiraju preko noći na temperaturi od 37 °C. Na osnovu zamućenja medija, bujona, odredi se da li je prisutan bakterijski rast ili ne. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najniža koncentracija ulja koja je spriječila rast bakterija. Jažice u kojima je medij ostao bistar sadržavaju dovoljno visoku koncentraciju uzorka potrebnu za inhibiciju rasta bakterija, dok u jažicama u kojima je došlo do zamućenja medija prisutno je ulje u koncentraciji nižoj od MIK vrijednosti.

Metoda omogućuje dobivanje kvantitativnih rezultata, a korištenje plastičnih mikrotitarskih ploča je metodu učinilo praktičnijom te je stoga nazvana je mikrodilucijskom metodom. Mikrotitarska ploča sadrži 96 jažica volumena 0,1 mL, što omogućuje analiziranje 12 uzoraka, pri čemu se u svakoj jažici nalazi različita koncentracija uzoraka.<sup>30</sup>

Da bi se odredila minimalna baktericidna koncentracija (MBK), iz jažica bez zamućenja i prve sa zamućenjem, izvrši se presijavanje na čvrstu hranjivu podlogu. Nakon inkubacije tijekom 18 h na 37 °C, ploče su pregledane na porast bakterijskih kolonija te je MBK određena kao najniža koncentracija koja ubija ~ 99,9% startnog inokuluma.

Za svaki eksperiment provedena su tri neovisna testiranja. Odnos MBK-a i MIK-a je značajan parametar koji govori o osjetljivosti bakterijskog soja. Sojevi bakterija kojima je odnos MBK-a i MIK-a veći od 32 se smatraju visoko tolerantnim na uzorak.<sup>31</sup>

### **1.7.2. Korišteni sojevi mikroorganizama**

Mikroorganizmi mogu živjeti jedni s drugima, ili u odnosu sa makroorganizmima. Njihov odnos može biti ili u obliku simbioze, ili parazitski. Parazitizam možemo podijeliti u dva oblika. Većina parazita ne škodi domaćinu, poput mikroorganizama koji čine normalnu floru čovjeka i životinja, nazvanom komenzalnom florom. Manji broj mikroorganizama se nije prilagodio životu u makroorganizmu, te oni uzrokuju lakše ili teže bolesti. Preventivne mjere protiv bolesti su održavanje higijene uz cijepljenje. Ako dođe do infekcije bolest se liječi antimikrobnim lijekovima. Mnogo je mikroorganizama stvorilo rezistenciju na antibiotike, pa se sve češće istražuju alternativni načini u liječenju infekcija.<sup>32</sup>

Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja ispitana je prema osam vrsta gram- pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* i *Streptococcus pneumoniae*), te prema jednoj Gram-negativnoj bakteriji (*Escherichia coli*). Također je ispitano antimikrobno djelovanje na dvjema gljivicama, kvasnici (*Candida albicans*) i na plijesni (*Aspergillus niger*).

### 1.7.2.1. Bakterije

Bakterije su prokariotski organizmi, što znači da nemaju pravu jezgru, nego imaju nukleoid. Najveći dio mase bakterije čini citoplazma u kojoj se nalazi nukleoid, plazmidi, ribosomi, različite otopljene organske i anorganske tvari, enzimi, proteini slični proteinima citoskeletona eukariota. Citoplazmu omeđuje citoplazmatska membrana, a nju stanična stijenka. Većina bakterija ima još jedan zaštitni sloj, najčešće sagrađen od ugljikohidrata, nazvan kapsula. Kreću se pomoću fila i flagela. Stanična stijenka je određena barijera za prolazak toksičnih tvari, te je stoga važno mjesto djelovanja pojedinih antibiotika. Prema građi stanične, bakterije dijelimo na gram-pozitivne i na gram-negativne. Stanična stijenka je izgrađena od polimera nazvanog peptidoglikan ili murein. Stjenka gram-pozitivnih bakterija je građena od debelog sloja peptidoglikana, čak i do 40 njegovih slojeva, dok gram-negativne imaju jedan do dva sloja.

*Staphylococcus aureus* je skupina gram-pozitivnih koka. Imaju polisaharidnu kapsulu, te na staničnoj stijenci imaju teikoičnu kiselinu, antigenski specifičnu za ovaj soj. Na krvnom agaru formira bjelkaste kolonije, koje s vremenom dobiju zlatnu boju (po tome su i dobili ime jer lat. *aureus* znači zlatni). Osjetljiv je na visoke temperature i na dezinficijense koji se koriste u bolnicama. Na suhim površinama mogu preživjeti prilično dugo, za rast im ne smeta prisutnost visokog postotka soli, ni visoka koncentracija šećera, što im omogućuje rast u različitoj hrani. Vrlo lako stječe rezistenciju na antibiotike. Izaziva trovanja hranom, sindrom opečene kože, stafilokokni sindrom toksičnog šoka, te različite vrste kožnih lezija.

*Streptococcus pyogenes* je okrugli koki koji raste u obliku parova i lančića. Kako je  $\beta$ -hemolitički streptokok, na krvnom agaru izraste u obliku sjajne i prozirne kolonije ( $\beta$ -hemoliza u potpunosti razara eritrocite). Usprkos tome što je dio normalne ždrijelne flore u velikog dijela ljudi, jedan je od najčešćih uzročnika bolesti. Preko cijele stanične stijenke protežu se fibrili sastavljeni od lipoteikoične kiseline i M-proteina, glavnog antigena na kojeg čovjek stvara protektivna protutijela. Osjetljiv je na vanjske uvjete, pa se prenosi bliskim kontaktom (kihanje, kašljanje). Uzročnik je dva tipa bolesti. Akutne gnojne infekcije uzrokovane čimbenicima invazivnosti *S. pyogenes* uključuju gnojnu upalu ždrijela, šarlah, celulitis, erizipel, itd. Drugi tip bolesti su poststreptokokne bolesti. Poststreptokokne bolesti se pojavljuju od 1 do 4 tjedna nakon akutne streptokokne infekcije. Dije se na akutnu reumatsku vrućicu, koja se liječi antimikrobnom terapijom, te na akutni glomerulonefritis, na kojeg ne djeluje antimikrobna terapija.

*Enterococcus faecalis* su izduženi, ovalni koki, koji se pojavljuju pojedinačno, u parovima ili u kratkim lancima. Izdvojeni su iz skupine streptokoka zato što su otporniji na fizikalne i kemijske agense, te ih većina posjeduje antigen grupe D. Dio su normalne flore probavnog sustava, ali ako se nađu na drugim organima, mogu uzrokovati infekcije mokraćnog sustava, endokarda, bakterijemiju. Mogu rasti uz visoke koncentracije žuči i natrijeva klorida, preživljavaju u nepovoljnim uvjetima, pa se mogu naći svugdje u okolišu.

*Bacillus cereus* su nepokretni, sporogeni štapići. To je ubikvitarna bakterija koja kod čovjeka uzrokuje trovanje hranom i infekcije oka. Trovanje hranom je uzrokovano pomoću dva toksina, termostabilnog “emetičkog” toksina koji se razvija pri rastu *B. cereus* u riži, te termolabilni “dijarealni” toksin, koji nastaje ako se *B. cereus* nađe u većoj količini u mesu i povrću.

*Clostridium perfringens* su anaerobni štapići, kod kojih *in vivo* ne nalazimo spore, a teško se stvaraju *in vitro*. Žive u tlu, vodi, otpadnim vodama, te kao normalna flora gastrointestinalnog sustava čovjeka i životinja, te u ženskom genitalnom sustavu. *C. perfringens* uzrokuje trovanje hranom, klostridijsku mionekrozu (plinska gangrena), nekrotizirajući enteritis, klostridijsku sepsu.

*Listeria monocytogenes* je aerobni ili fakultativno anaerobni štapić bez kapsule. Na krvnom agaru kolonije su okružene uskom zonom  $\beta$ -hemolize. Fakultativni je unutarstanični parazit brojnih eukariotskih stanica (enterocita, fibroblasta, hepatocita i makrofaga). U čovjekov organizam ulazi kroz probavni sustav, potom prolazi crijevnu barijeru, te putem krvi inficiraj hepatocite. Nadalje, dolazi do nekontrolirane proliferacije bakterija u jetri. Ima tropizam prema posteljici i mozgu. Može uzrokovati sepsu, bakterijemiju, meningitis, meningoencefalitis, itd.<sup>32</sup>



**Slika 21.** *Listeria monocytogenes*<sup>34</sup>

*Micrococcus luteus* se nalazi u prašini, tlu, zraku, vodi, te se također nalazi na koži sisavaca. Kod ljudi se još nalazi i u gornjem dijelu dišnog sustava. Nije patogena za ljude.<sup>33</sup>

*S. pneumoniae* je gram-pozitivni koki koji se nalazi u paru ili u kratkom lancu. Na krvnom agaru raste u sitnim kolonijama sa izraženom zonom  $\alpha$ - hemolize, a u anaerobnim uvjetima mogu biti i  $\beta$ -hemolitičke. Kod nekih ljudi se može pronaći kao normalna flora nazofarinksa. Pneumokoki su sposobni u sklopu mehanizma “quorum sensing” uzeti iz okoline veće fragmente DNA drugih stanica istog soja ili čak nekih drugih bakterija, proces nazvan transformacija. Transformacijom *S. pneumoniae* može steći novi kapsularni oblik. Mehanizam omogućuje stvaranje rezistencije na antibiotike. Bakterija je osjetljiva na isušivanje, povišene temperature, dezificijense, te površinski aktivne tvari. Uzrokuje upale pluća, upale srednjeg uha kod djece, akutni gnojni meningitis, itd.<sup>32</sup>

*Escherichia coli* su pokretni kratki gram-negativni štapići. Može preživjeti određeni period vremena u vodi, zemlji, dok se u hrani lako i brzo razmnožava. Osjetljiva je na dezificijense. Prisutna je u normalnoj crijevnoj flori, ali može biti povezana sa infekcijom svakog organa i tkiva. U zemljama u razvoju jedna je od vodećih uzročnika mortaliteta u ranoj dječjoj dobi. Uzrokuje gastroenteritis, infekciju mokraćnih puteva i neonatalni meningitis.<sup>32</sup>



**Slika 22.** *Escherichia coli*<sup>35</sup>

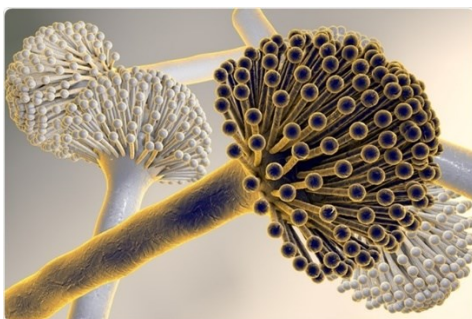
### 1.7.2.2. Gljivice

U posljednja dva desetljeća sve je više invazivnih gljivičnih bolesti, uzrokovanih oportunističkim gljivičnim patogenima, a uzrok tome je sve veći broj bolesnika kod kojih je pogodan njihov nastanak (osobe nakon presadbe krvotvornih matičnih stanica, transplatacije solidnih organa, kirurških zahvata posebno na gastrointestinalnom traktu, oboljeli od AIDS-a, itd.).

*Candida albicans* je gljivica koja uzrokuje kandidozu usne šupljine, kandidozu rodnice, te kožnu kandidozu.<sup>32</sup>

Plijesni su gljivice čije se tijelo sastoji od dobro razvijenog micelija. Uglavnom su saprofiti koji žive na različitim organskim tvarima.

*Aspergillus niger* je plijesan iz roda *Aspergillus*. Plijesni iz tog roda rastu u obliku kolonija koje makroskopski mogu biti crne, smeđe, zelene, žute, bijele, što sve ovisi o vrsti i uvjetima okoline. Hife su im razgranate i septirane. *Aspergillus* izaziva alergijske reakcije, infekcije paranazalnih sinusa i donjeg respiratornog sustava, te invazivnu plućnu aspergilozu.<sup>32</sup>



**Slika 23.** Digitalna ilustracija *Aspergillus niger*<sup>36</sup>



## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Priprema uzorka

Dana 08. veljače 2019. godine izvršeno je prikupljanje grančica pinja, primorskog bora i pukinje. Na Zvončacu su prikupljeni uzorci pinja i primorskog bora. Koordinate lokacije branja pinja (*Pinus pinea* L.) su bile  $x = 5615628$ ,  $y = 4818542$ , na nadmorskoj visini od 1 m, a primorskog bora (*Pinus pinaster* Aiton)  $x = 5615592$ ,  $y = 4818660$  i nadmorske visine 10 m. Na Kašunima je prikupljena pukinja (*Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa*) na koordinatama  $x = 5613565$ ,  $y = 4819130$ , te nadmorskoj visini od 24 m.

Grančice su se sušile pri sobnoj temperaturi bez izlaganja direktnom suncu, čega su iglice odvojene od grančica.

### 2.2. Korišteni uređaji i kemikalije

Uređaji:

- plinski kromatograf (model 3900; Varian Inc., Lake Forest, CA, USA)
- spektrometar masa (model 2100T; Varian Inc., Lake Forest, CA, USA)
- uređaj za uparavanje s dušikom (Dri Block DB100/3, Techne, UK)
- višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan GmbH, Austrija)
- inkubator (model INB200, Memmert, Njemačka)
- inkubatorska tresilica (model Certomat IS, Sartorius, Njemačka)
- autoklav (model 3870EA, Tuttnauer, USA)

Kemikalije:

- pentan (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika)
- dietil-eter (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španjolska)
- bezvodni natrijev sulfat (AnalaR Normapur, Leuven, Belgija)
- diklormetan (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- natrijev-klorid (T.T.T. d.o.o.)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH<sup>•</sup>, Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- natrijev acetat (Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija)
- natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2,4,6-tripiridil-s-tirazin (TPTZ, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka)

- željezov (III) klorid (Sigma Aldrich GmbH)
- etanol (T.T.T. d.o.o.)
- DTNB, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (Sigma-Aldrich GmbH)
- ATChI, acetiltiokolin jodid (Sigma-Aldrich GmbH)
- AChE, enzim acetilkolinesteraza Tip V-S (E.C. 3.1.1.7, iz elektrofora električne jegulje) (Sigma-Aldrich GmbH)
- BuTChI, butirilkolin jodid (Sigma-Aldrich GmbH)
- BuChE, butirilkolinesteraza (E.C. 3.1.1.8, iz konjskog seruma) (Sigma-Aldrich GmbH)
- Luria-Bertani tekući medij (Biolife, Italija)
- triptikaza sojin agar (TSA; Biolife)
- Sabouraud dekstrozni agar (SDA; Biolife)
- Sabouraud dekstrozni bujon (SDB; Biolife)
- Mueller-Hinton tekući medij (MHB; Biolife)
- Mueller-Hinton agara (MHA; Biolife)

### 2.3. Izolacija eteričnih ulja

Eterična ulja iz iglica primorskog bora, pinja i pukinje urađena je postupkom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru. U tikvicu sa okruglim dnom stavljen je biljni materijal i destilirana voda. Središnja cijev ispunjena je destiliranom vodom i trapom. Trap je sastavljen od 6 mL pentana i 2 mL dietil-etera. Tokom destilacije u središnjoj cijevi dolazi do razdvajanja gornjeg sloja ulja, i donjeg, vodenog sloja. Vodena destilacija je trajala tri sata. Nakon što se aparatura ohladila, sa gornje strane središnje cijevi pipetom je odvađeno eterično ulje. Ulje je prebačeno u posebne bočice, a ostatak emulgirane vode iz ulja je uklonjen dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata.

Iz svake bočice je uzeto 200  $\mu$ L ulja za GC-MS analizu, te mu je pridodano po 1 mL (1000  $\mu$ L) pentana.

Sadržaj svake bočice je uparen u struji dušika kako bi se uklonio višak otapala (trapa) nakon čega je dodano po 5 mL etanola, te su iste čuvane u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C.

**Tablica 4.** Iskorištenje na 100 g suhog materijala

Uzorak	Iskorištenje (%)
<i>Juniperus oxycedrus</i> spp. <i>macrocarpa</i> .	0,05
<i>Pinus pinea</i> L.	0,07
<i>Pinus pinaster</i> Aiton	0,11

## 2.4 GC-MS kemijska analiza eteričnog ulja

Pomoću plinskog kromatografa, model 3900 (Varian Inc.), sa plamenoionizacijskim detektorom (FID), te spektrometrom masa (MS) model 2100T (Varian Inc.) napravljena je kvalitativna analiza pripremljenih uzoraka pri čemu je korištena nepolarna kolona VF-5MS, dimenzija 30 m dužine, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine stacionarne faze 0,25  $\mu\text{m}$ . Početna temperatura analize bila je 60 °C tijekom tri minute, nakon čega se povećala na 246 °C brzinom 3 °C u jednoj minuti, te je tako ostala izotermalno 25 minuta. Ukupno trajanje mjerenja iznosi 90 minuta. Kao plin nosioc koristio se helij s brzinom protoka od 1 mL min<sup>-1</sup>. Ionizacijski potencijal je bio 70 eV. Pikovi su identificirani usporedbom vremena njihovog zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju *n*-alkana C<sub>9</sub>-C<sub>30</sub> za VF-5MS kolonu) sa podacima iz literature (Adams, 2017) i sa vremenima zadržavanja komercijalnih standarda.

## 2.5. Metode bioloških ispitivanja

### 2.5.1. DPPH metoda

Mjerenje se izvodilo pomoću višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan GmbH, Austria) sa automatskim miješanjem i opcijom snimanja podataka na računalo. U otvore mikrotitarske pločice se otpipetira smjesa od 200  $\mu$ L pripravljene otopine DPPH i 10  $\mu$ L uzorka različitih razrjeđenja. Promjena apsorbancije se pratila pri valnoj duljini od 517 nm, u svakoj minuti tijekom vremena od jednog sata, nakon čega se postotak inhibicije DPPH radikala se računao preko formule:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

gdje je:

$A_{C(0)}$  – apsorbancija kontrole (otopina DPPH radikala) na početku ( $t = 0$  minuta)

$A_{A(t)}$  – apsorbancija reakcijske smjese na kraju ( $t = 60$  minuta).

### 2.5.2. FRAP metoda

Priprema otopina za FRAP reagens:

- priprema acetatnog pufera (0,3 M; pH=3,6; 1L): pomiješa se 3,1 g natrij-acetata trihidrata i 16 mL glacijalne octene kiseline, te se nadopuni vodom do volumena od 1 L
- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-*s*-tirazin (TPTZ) u 40 mM HCl: otopi se 0,031g TPTZ-a u 10 mL 40 mM otopine HCl
- Otopina željezo (III) heksahidrata ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ): otopi se 0,054 g željezo (III) heksahidrata u destiliranoj vodi i nadopuni se do 10 mL.

Priprema FRAP reagensa:

- Pomiješa se 25 mL acetatnog pufera sa 2,5 mL otopine TPTZ-a i 2,5 mL otopine željezovog (III) heksahidrata.
- Priprema standardne kalibracijske krivulje (priprema matične otopine 2 mM željezo (II) sulfata heptahidrata ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ):
- Otopi se 0,0056 g ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) u 10 mL destilirane vode.

Mjerenje se izvodilo pomoću višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 592 nm i pri 37 °C. U 225 µL svježe pripravljene otopine FRAP reagensa doda se 10 µL uzorka različitih koncentracij,. Apsorbancije se očitava svakih 25 sekundi, a mjerenje traje 8 minuta. Za izračun FRAP vrijednosti radi se jednadžba pravca ovisnosti promjene apsorbancije o koncentraciji Fe<sup>2+</sup>, koji služi kao standard. Promjena apsorbancije se izračuna kao razlika između konačne i početne vrijednosti, koje se usporede sa vrijednostima koje su dobivene za otopinu standarda. .

### 2.5.3. Ellmanova metoda

Priprema reagensa:

1. Priprema reagensa za ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze:

- otopina DTNB: otopi se 13,079 mg DTNB u 5 mL pufera pH=7
- otopina ATChI: otopi se 15,9 mg ATChI u 5 mL pufera pH=8
- otopina AchE: izmješa se 20 µL AchE s 5 mL pufera pH=8

2. Priprema reagensa za ispitivanje sposobnosti inhibicije butirilkolinesteraze:

- otopina DTNB: otopi se 13,079 mg DTNB u 5 mL pufera pH=7
- otopina S-BuTChI: otopi se 17,45 mg S-BuTChI u 5 mL pufera pH=8
- otopina BuChE: otopi se 28 µL BuChE sa 5 mL pufera pH=8

Mjerenje inhibicije enzima se vršilo na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločice pri 405 nm.

**Tablica 5.** Shema dodavanja u jažice za ispitivanje inhibicije acetilkolinesteraze

	Kontrola vode	Kontrola EtOH	BL1	BL2	Uzorak M	Uzorak BL
Pufer (μL)	190	180	200	190	180	190
DTNB (μL)	10	10	10	10	10	10
Uzorak (μL)	/	/	/	/	10	10
EtOH (μL)	/	10	/	/	/	/
AchE (μL)	10	10	/	10	10	/
ATChI (μL)	10	10	10	10	10	10

ATChI, tj. supstrat, se dodaje neposredno prije početka mjerenja, jer s njime započinje reakcija. Slijepim probama, “blank” mjerenjima (BL1 i BL2), praćena je ne-enzimska hidroliza.

Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze računa se prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije AChE} = [(A_K - A_A / A_K)] \times 100$$

gdje je:

$A_K$  – apsorbancija test otopine,

$A_A$  – apsorbancija kontrolnog uzorka.

**Tablica 6.** Shema dodavanja u jažice za ispitivanje inhibicije butirilkolinesteraze

	Kontrola vode	Kontrola EtOH	BL1	BL2	Uzorak M	Uzorak BL
Pufer (μL)	190	180	200	190	180	190
DTNB (μL)	10	10	10	10	10	10
Uzorak (μL)	/	/	/	/	10	10
EtOH (μL)	/	10	/	/	/	/
BuTChE (μL)	10	10	/	10	10	/
BuTChI (μL)	10	10	10	10	10	10

BuTChI, tj. supstrat, se dodaje neposredno prije početka mjerenja, kako s njim započinje reakcija.

Sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze računa se prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije BuChE} = [(A_K - A_A / A_K)] \times 100$$

gdje je:

$A_K$  – apsorbancija test otopine,

$A_A$  – apsorbancija kontrolnog uzorka.

## 2.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Određivanje antimikrobne aktivnosti izabranih vrsta bakterija, kvasaca i plijesni provedena su metodom mikrodilucije. Izabrani mikrobnii sojevi su bili pohranjeni -80 °C u Luria-Bertani tekućem mediju (Biolife, Italija) uz dodatak glicerola, te subkultivirani na triptikaza sojinom agaru (TSA; Biolife). U slučaju gljivica korišten je Sabouraud dekstrozni agar (SDA; Biolife). Testovi su provedeni prema smjernicama Instituta za kliničke laboratorijske standarde (CLSI, 2008a; 2008b; 2016), uz iznimku ispitivanja antifungalne osjetljivosti koje je provedeno u Sabouraud dekstroznom bujonu (SDB; Biolife). Bakterije su uzete s ploče TSA agara i resuspendirali smo ih u 5 mL Mueller-Hinton tekućeg medija (MHB; Biolife). Inkubirani su u tresilici preko noći na 37 °C pri 100 okretaja u minuti. Prekonoćna kultura je nadalje razrijeđena u omjeru 1:100 svježim MHB i inkubirana u tresilici 2 sata pri jednakim uvjetima do sredine logaritamske faze. Potom su stanične kulture podešene spektrofotometrijski na denzimetru kako bi se postigla optička gustoća koja odgovara broju od  $10^8$  bakterijskih stanica u jednom mL,  $0,5-2,5 \times 10^3$  spora u jednom mL za kvasce i  $0,4-5 \times 10^4$  spora u jednom mL za plijesni. Mikrotitarske pločice su se punile tako što je u prvi stupac jažica dodano 60  $\mu$ L ulja i 40  $\mu$ LMHB. U sve ostale stupce jažica se dodalo 50  $\mu$ L agara. Napravljeno je serijsko razrijeđenje prebacivanjem 50  $\mu$ L otopine iz prvog stupca jažica u drugi, i potom iz drugog i treći, i tako redom dalje. Tako je u svakoj idućoj jažici dvostruko manja koncentracija eteričnog ulja. Zatim se doda alikvot suspenzije mikroorganizama od 50  $\mu$ L u sve jažice. Mikrotitarske pločice su inkubirane 18 sati na 37 °C u slučaju testiranja bakterija i kvasaca, te 48 h na 28 °C u slučaju plijesni. Nakon inkubacije se vizualno ustanovi ima li zamućenja u jažici. Prva koncentracija ulja kod kojeg nema vidljivog zamućenja naziva se minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Kako bi se odredila minimalna baktericidna koncentracija (MBK), alikvoti iz jažica koje odgovaraju vrijednostima MIK,  $2 \times$ MIK i  $4 \times$ MIK su inokulirani na pločama Mueller-Hinton agara (MHA; Biolife). Ploče su stavljene u inkubator 18 sati na 37 °C, nakon brojenja porasta bakterijskih kolonija određena je MBK, tj. najniža koncentracija koja ubija ~ 99,9% startnog inokuluma.

Za sojeve gljivica, iz svih jažica određeni alikvoti su nasijani na SDA i inkubirani 24 h u slučaju *C. albicans*, odnosno 48 h u slučaju *A. niger*. Nakon pregleda ploča, MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> se odrede kao najniže koncentracije koje inhibiraju 50 % odnosno 90 % rasta gljivica u usporedbi s rastom kontrole (bez dodatka ulja). Svi eksperimenti su napravljeni tri puta.



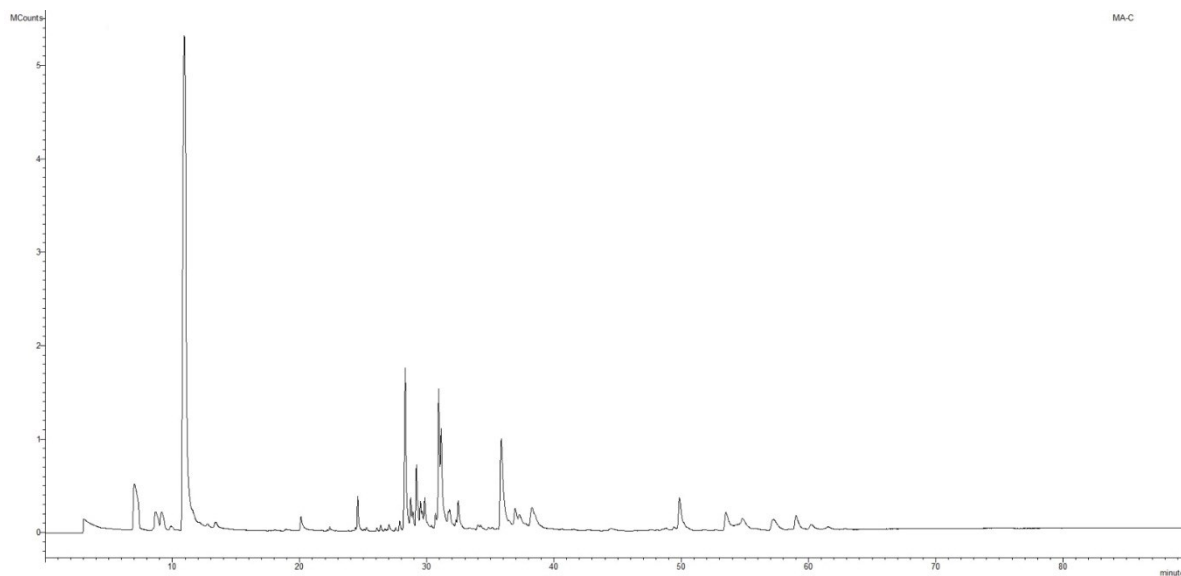
**Tablica 7.** Koncentracije eteričnih ulja

Porijeklo eteričnog ulja	Početna koncentracija ulja (mgmL <sup>-1</sup> )	Koncentracija ulja u prvoj jažici nakon dodatka inokuluma (μgmL <sup>-1</sup> )
<i>Juniperus oxycedrus</i> <i>ssp. macrocarpa</i>	7,68	2304
<i>Pinus pinea</i>	23,64	7092
<i>Pinus pinaster</i>	69,96	20988

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

##### 3.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja iglica pinja (*Pinus pinea* L.)



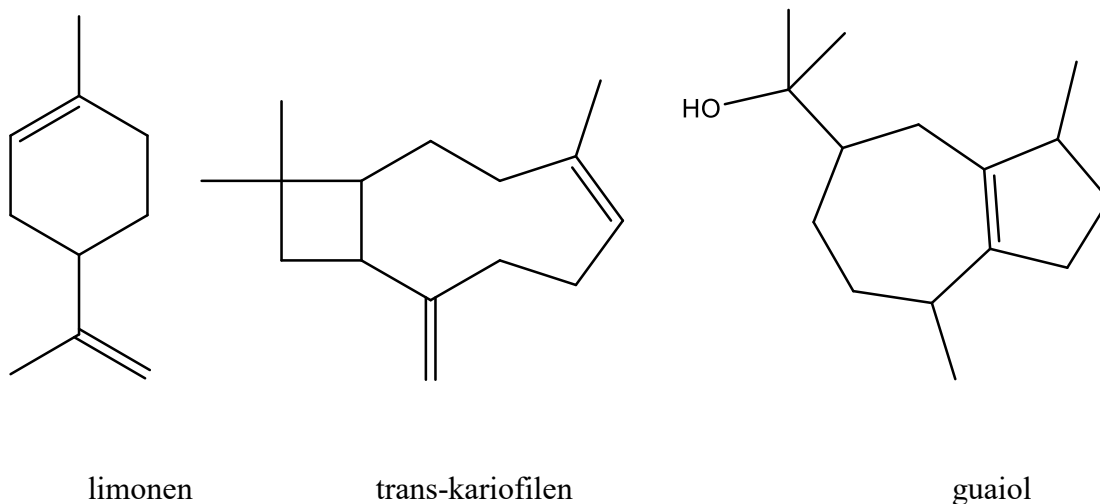
Slika 23. Kromatogram eteričnog ulja iglica pinja

**Tablica 8.** Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja iz iglica pinja

Redni broj	Naziv spoja	%	KI	Ni
<b>Monoterpenoidi</b>				
1.	$\alpha$ -pinen	4,53	924	MS, RI, St
2.	sabinen	1,18	970	MS, RI
3.	$\beta$ -pinen	1,53	981	MS, RI, St
4.	$\alpha$ -felandren	0,33	998	MS, RI
5.	limonen	42,57	1024	MS, RI, St
6.	$\alpha$ -terpinolen	0,33	1078	MS, RI, St
7.	metil-eter-karvakrol	0,81	1222	MS, RI
<b>Seskviterpenoidi</b>				
8.	$\delta$ -elemen	1,07	1319	MS, RI
9.	$\alpha$ -kopaen	0,18	1362	MS, RI
10.	izolongifolen	0,32	1393	MS, RI
11.	<i>trans</i> -kariofilen	6,69	1403	MS, RI, St
12.	$\beta$ -kalaren	1,07	1414	MS, RI
13.	aristolen	2,54	1424	MS, RI
14.	$\alpha$ -humulen	1,18	1441	MS, RI
15.	$\gamma$ -muurolen	0,45	1466	MS, RI
16.	germakren D	4,85	1477	MS, RI
17.	$\delta$ -selinen	4,91	1492	MS, RI
18.	$\delta$ -kadinen	1,13	1503	MS, RI
19.	guaiol	5,87	1586	MS, RI
20.	kubenol	0,95	1616	MS, RI
21.	$\gamma$ -eudezmol	2,04	1630	MS, RI
<b>Diterpenoidi</b>				
22.	sandarakopimaradien	1,72	1977	MS, RI
23.	(11 <i>E</i> ,13 <i>Z</i> )-labdadien-8-ol	1,75	2091	MS, RI
24.	(12 <i>Z</i> )-abienol	1,61	2136	MS, RI
25.	metil levopimararat	1,50	2278	MS, RI
26.	metil-dehidroabietat	0,62	2319	MS, RI
	<b>Ukupno:</b>	91,73		

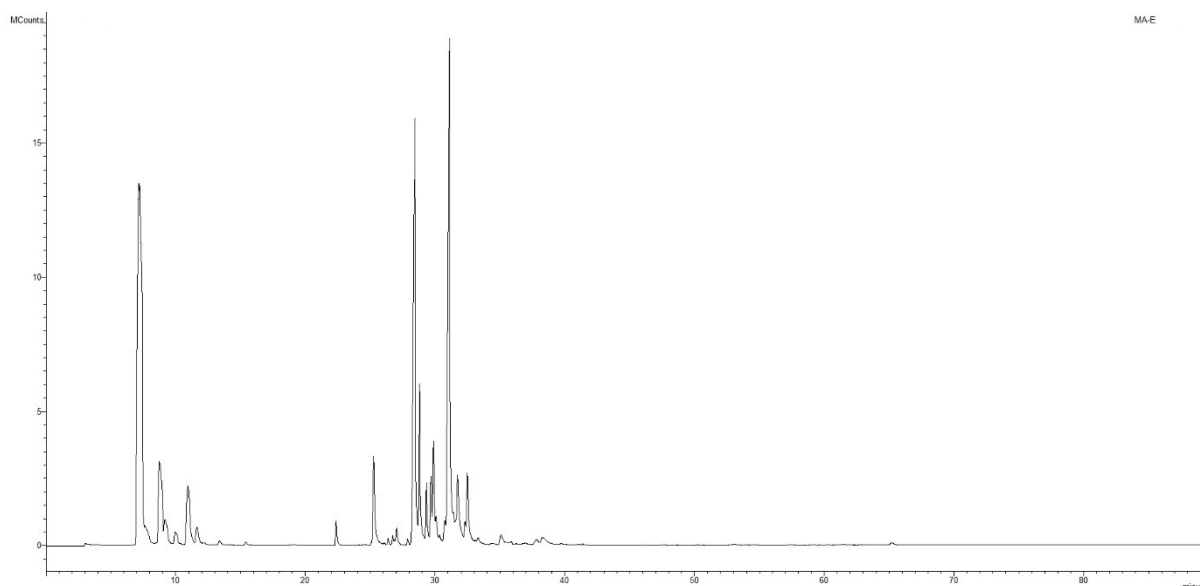
% - udio pojedinog spoja u eteričnom ulju, KI – Kovačevi indeksi za VF-5MS kolonu, Ni – način identifikacije, MS – identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara (Wiley 7 i NIST 02), RI - identifikacija potvrđena literaturnim Kovačevim retencijskim indeksom, St – identifikacija potvrđena komercijalnim standardom, - spoj nije identificiran.

Najzastupljeniji spojevi u eteričnom ulju pinja su bili monoterpenoid limonen (42,57 %), i sekviterpenoidi: *trans*-kariofilen i guaiol (6,69 % i 5,87 %). Limonen se koristi za otapanje žučnih kamenaca koji sadrže kolesterol. Također se koristi za ublažavanje žgaravice, jer neutralizira želučane kiseline, te mu je ustanovljena kemopreventivna aktivnost. Guaiol je poznat po svojim inflamatornim, antiparazitnim i antioksidativnim svojstvima. Njihove strukture su dane na slici 24.



**Slika 24.** Strukture najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja iglica pinja.

### 3.1.2. Kemijski sastav eteričnog ulja iglica primorskog bora (*Pinus pinaster* Aiton)



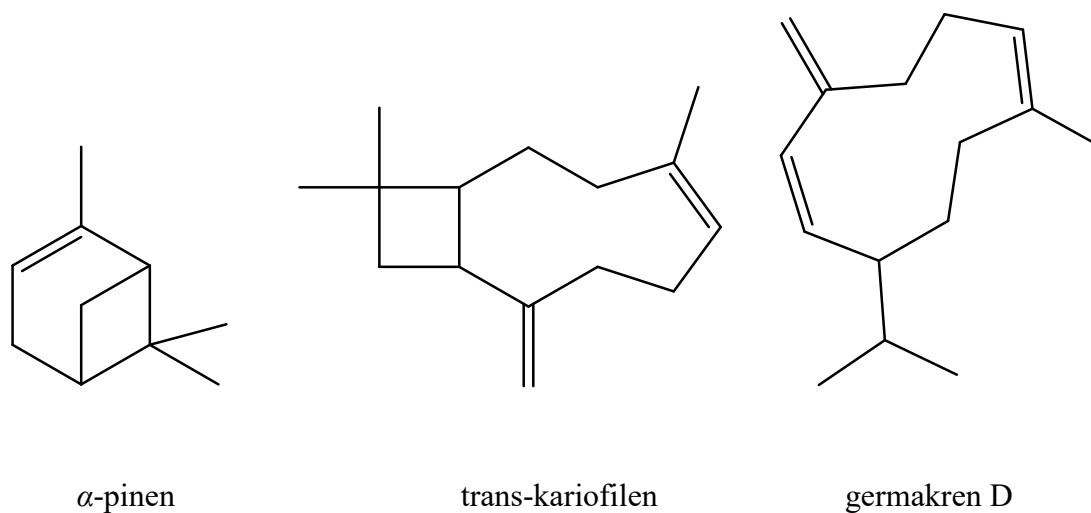
**Slika 25.** Kromatogram eteričnog ulja iglica primorskog bora

**Tablica 9.** Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja iglica primorskog bora

Redni broj	Naziv spoja	%	KI	Ni
Monoterpenoidi				
1.	$\alpha$ -pinen	28,52	924	MS, RI, St
2.	sabinen	4,77	970	MS, RI
3.	$\beta$ -pinen	1,38	981	MS, RI, St
4.	$\delta$ -3-karen	0,61	1003	MS, RI, St
5.	limonen	3,30	1024	MS, RI, St
6.	<i>cis</i> - $\beta$ -ocimen	0,96	1041	MS, RI
7.	$\alpha$ -terpinolen	0,19	1078	MS, RI, St
8.	<i>allo</i> -ocimen	0,13	1119	MS, RI
9.	bornil acetat	0,62	1271	MS, RI, St
10.	$\alpha$ -terpinil acetat	3,32	1336	MS, RI, St
Seskviterpenoidi				
11.	$\alpha$ -kopaen	0,13	1362	MS, RI
12.	$\beta$ -burbonen	0,21	1368	MS, RI
13.	$\beta$ -elemen	0,10	1374	MS, RI, St
14.	longifolen	0,14	1392	MS, RI
15.	<i>trans</i> -kariofilen	15,56	1403	MS, RI, St
16.	$\beta$ -kalaren	4,20	1414	MS, RI
17.	$\beta$ -kopaen	1,62	1434	MS, RI
18.	$\beta$ -gurjunen	1,63	1436	MS, RI
19.	$\alpha$ -humulen	2,56	1441	MS, RI
20.	aromadendren	0,90	1445	MS, RI
21.	$\alpha$ -amorfen	0,68	1461	MS, RI
22.	germakren D	21,31	1477	MS, RI
23.	$\alpha$ -muurolen	1,63	1483	MS, RI
24.	$\gamma$ -kadinen	0,29	1497	MS, RI
25.	$\delta$ -kadinen	1,97	1503	MS, RI
26.	<i>epi</i> - $\alpha$ -kadinol	0,30	1640	MS, RI
27.	$\alpha$ -kadinol	0,70	1651	MS, RI
	<b>Ukupno:</b>	97,73		

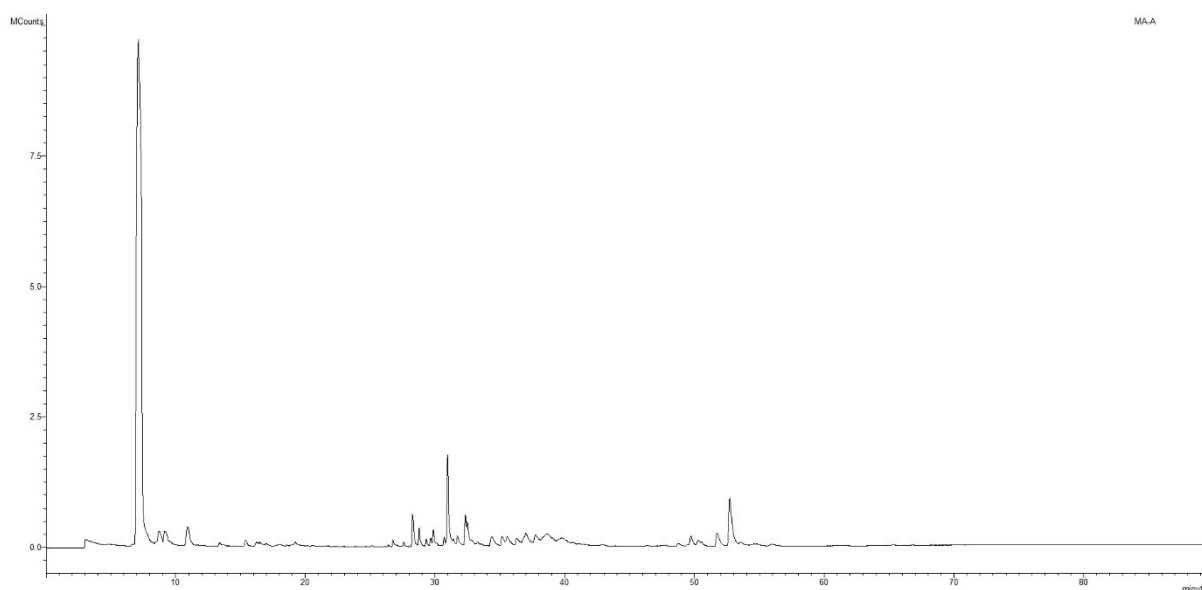
% - udio pojedinog spoja u eteričnom ulju, KI – Kovačevi indeksi za VF-5MS kolonu, Ni – način identifikacije, MS – identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara (Wiley 7 i NIST 02), RI – identifikacija potvrđena literaturnim Kovačevim retencijskim indeksom, St – identifikacija potvrđena komercijalnim standardom, - spoj nije identificiran.

Najzastupljeniji spojevi u eteričnom ulju primorskog bora su bili monoterpenoid  $\alpha$ -pinen (28,52 %), i sekviterpenoidi: *trans*-kariofilen i germakren D (15,56 i 21,31 %).  $\alpha$ -Pinen ima protuupalna, antimikrobna i gastroprotektivna svojstva. Također ima inhibitorna svojstva protiv enzima acetilkolinesteraze. Germakren D je naveden u mnogim radovima, kao spoj, koji ima visoka antimikrobna djelovanja. Njihove strukture su dane na slici 26.



Slika 26. Strukture najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja iglica primorskog bora.

### 3.1.3. Kemijski sastav eteričnog ulja iglica pukinje (*Juniperus oxycedrus* spp. *Macrocarpa* Sibth. & Sm.)



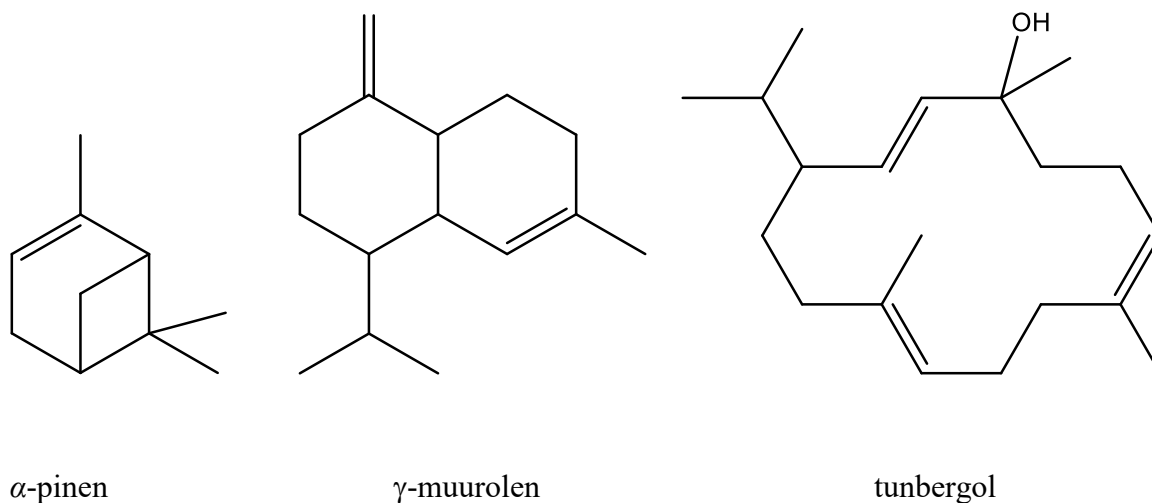
Slika 27. Kromatogram eteričnog ulja iglica pukinje

**Tablica 10.** Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja iglica pukinje

Redni broj	Naziv spoja	%	KI	Ni
<b>Monoterpenoidi</b>				
1.	( <i>E</i> )-2-heksenal	tr	852	MS, RI
2.	$\alpha$ -pinen	64,85	924	MS, RI, St
3.	sabinen	1,19	970	MS, RI
4.	$\beta$ -pinen	1,65	981	MS, RI, St
5.	limonen	1,90	1024	MS, RI, St
6.	6-kamfenol	0,43	1119	MS, RI
<b>Seskviterpenoidi</b>				
7.	izoleden	0,16	1386	MS, RI
8.	$\alpha$ -gurjunen	1,87	1401	MS, RI
9.	$\beta$ -gurjunen	0,83	1436	MS, RI
10.	humulen	0,48	1441	MS, RI
11.	$\beta$ -kadinen	0,33	1457	MS, RI
12.	$\gamma$ -muurolen	5,00	1466	MS, RI
13.	$\gamma$ -kadinen	1,12	1497	MS, RI
14.	$\delta$ -kadinen	0,96	1503	MS, RI
15.	kariofilen oksid	0,63	1569	MS, RI, St
16.	kubenol	1,56	1616	MS, RI
17.	$\alpha$ -kadinol	1,18	1651	MS, RI
<b>Diterpenoidi</b>				
18.	manoil oksid	0,65	1978	MS, RI
19.	abietatrien	1,19	2034	MS, RI
20.	tunbergol	5,00	2065	MS, RI
	<b>Ukupno:</b>	90,98		

% - udio pojedinog spoja u eteričnom ulju, KI – Kovačevi indeksi za VF-5MS kolonu, Ni – način identifikacije, MS – identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara (Wiley 7 i NIST 02), RI - identifikacija potvrđena literaturnim Kovačevim retencijskim indeksom, St – identifikacija potvrđena komercijalnim standardom, - spoj nije identificiran, tr - tragovi

Najzastupljeniji spojevi u eteričnom ulju pukinje su bili monoterpenoid  $\alpha$ -pinen (64,85 %), i sekviterpenoidi:  $\gamma$ -muuroolen (5,00 %) i diterpenoid tunbergol (5,00 %). Njihove strukture su dane na slici 28.



**Slika 28.** Strukture najzastupljenijih spojeva eteričnog ulja iz iglica pukinje.

### 3.2. Antioksidacijska aktivnost izmjerena FRAP metodom

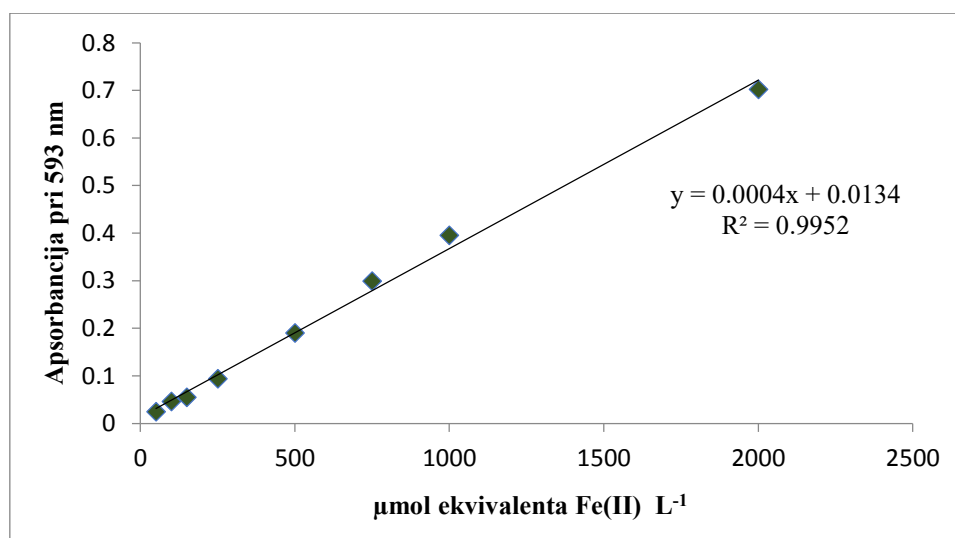
FRAP metoda mjeri sposobnost antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju reducira žuti kompleks željeza(III) sa TPTZ-om u plavo obojeni kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, pri čemu se spektrofotometrijski izmjeri intenzitet nastalog obojenja pri 593 nm. Za izradu baždarnog pravca, koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji ekvivalenta  $\text{Fe(II)}$ , podatci su prikazani u tablici 11.



**Tablica 11.** Koncentracija ekvivalenta željeza (II) i izmjerena apsorbancija pri 593 nm

$c(\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{molL}^{-1}$	Apsorbancija pri 593 nm
2000	0,701875
1000	0,395375
750	0,299375
500	0,190375
250	0,093875
150	0,054875
100	0,046375
50	0,024375

Pomoću podataka iz tablice konstruiran je baždarni pravac koji pokazuje ovisnost apsorbancije i koncentracije.



**Slika 26.** Baždarni pravac koji omogućava izračun FRAP vrijednosti

Pri najvišoj koncentraciji od  $21,28 \mu\text{g mL}^{-1}$  eterična ulja su pokazala antioksidacijsku aktivnost. Najveću aktivnost je imalo eterično ulje iglica primorskog bora, zatim pinja, pa pukinje, u vrijednostima od  $454 \mu\text{mol ekvivalenta Fe(II)L}^{-1}$ ,  $444 \mu\text{mol ekvivalenta Fe(II)L}^{-1}$  i  $374 \mu\text{mol ekvivalenta Fe(II)L}^{-1}$ .

### 3.3. Antioksidacijska aktivnost izmjerena DPPH metodom

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikal u reakciji s antioksidansima se reducira u blijedo žuti hidrazinski oblik. Sposobnost antioksidansa, tj. eteričnog ulja, da reducira DPPH radikal pratilo se mjerenjem promjene apsorbancije pri 517 nm. Pri najvećoj koncentraciji od 22,72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  najveću antioksidacijsku aktivnost imalo je ulje pukinje koja iznosi 8,99 %. Nadalje, eterično ulje pinja je imalo 5,14 %, a eterično ulje primorskog bora nije pokazalo antioksidacijsku aktivnost. Niskoj antioksidacijskoj aktivnosti je uzrok to što ulja sadrže malu količinu kisikovih spojeva, koji bi imali bolji antioksidacijski učinak.

### 3.4. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze

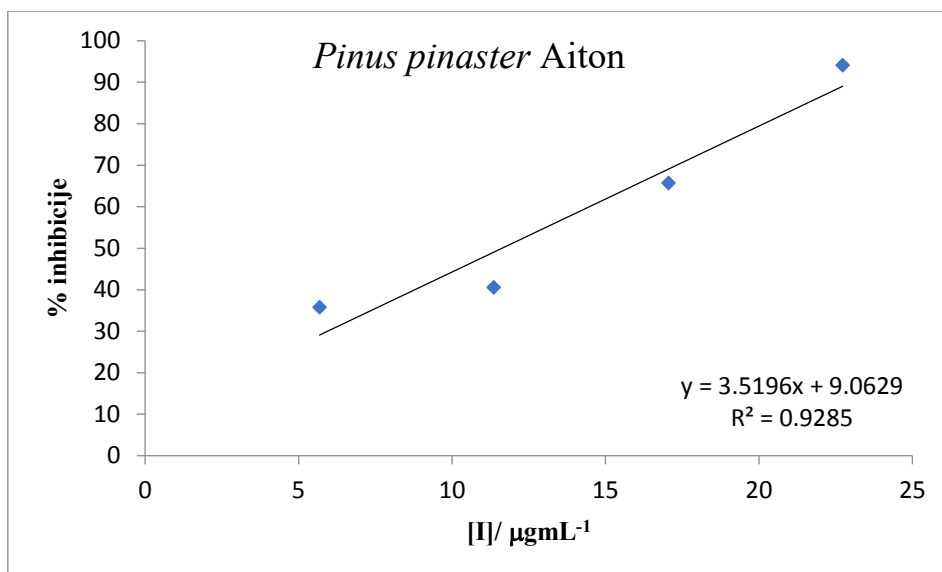
Metodom po Ellmanu je ispitana sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze. Određen je postotak inhibicije za različite koncentracije uzoraka eteričnih ulja iz iglica pinja, primorskog bora i čempresa. Tablica 12. prikazuje rezultate inhibicijskog djelovanja različitih koncentracija uzoraka eteričnih ulja na enzim acetilkolinesterazu.

**Tablica 12.** Postotci inhibicije enzima acetilkolinesteraze

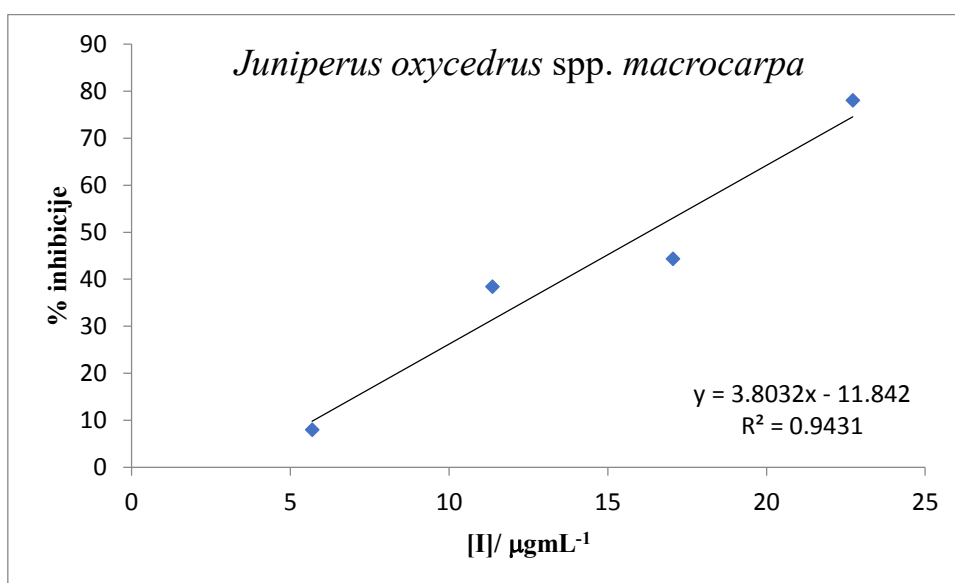
[I] / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inhibicija / %		
	<i>Pinus pinea</i> L.	<i>Pinus pinaster</i> Aiton	<i>Juniperus oxycedrus</i> spp. <i>macrocarpa</i> Sibth. & Sm.
5,68	/	35,81	7,96
11,36	59,21	40,58	38,41
17,05	/	65,73	44,29
22,72	/	94,08	78,03

/ - nema aktivnosti

Na daljnjim slikama prikazana je ovisnost postotka inhibicije o koncentraciji eteričnih ulja primorskog bora i pukinje.



**Slika 27.** Prikaz ovisnosti postotka inhibicije o koncentraciji eteričnog ulja primorskog bora (*Pinus pinaster* Aiton);  $IC_{50}=13,64 \mu\text{g mL}^{-1}$



**Slika 28.** Prikaz ovisnosti postotka inhibicije o koncentraciji eteričnog ulja pukinje (*Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa* Sibth. & Sm.);  $IC_{50}= 18,18 \mu\text{g mL}^{-1}$

### 3.5. Sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze

Sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze ispitana je metodom po Ellmanu. Tablica 13. prikazuje rezultate djelovanja inhibicije različitih koncentracija eteričnih ulja na enzim butirilkolinesterazu.

**Tablica 13.** Postoci inhibicije enzima butirilkolinesteraze

[I] / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inhibicija / %		
	<i>Pinus pinea</i> L.	<i>Pinus pinaster</i> Aiton	<i>Juniperus oxycedrus</i> spp. <i>macrocarpa</i> Sibth. & Sm.
<b>17,05</b>	23,88	15,71	25,00
<b>22,72</b>	/	35,10	35,90

Primorski bor i pukinja imaju vrlo slične rezultate, dok se pinj razlikuje. Pri koncentraciji ulja od  $17,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  inhibicija BChE je za pinj iznosila 23,88 %, pukinje 25,00 %, te je primorski bor postigao najlošiji postotak inhibicije od 15,71%. Kako smo povećali koncentraciju inhibitora narastao je i postotak inhibicije. Pri koncentraciji od  $22,72 \mu\text{g mL}^{-1}$  primorski bor je postigao postotak inhibicije od 35,10 %. Pukinja je imala vrlo sličan rezultat od 35,90 % pri toj koncentraciji. Eteričnom ulju iglica pinja se nije mogla odrediti inhibicija pri toj koncentraciji, jer je dolazilo do zamućenja.

### 3.6. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja određena metodom mikrodilucije

**Tablica 14.** Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja iz iglica pukinje, pinja i primorskog bora ispitana metodom mikrodilucije ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

	<i>Juniperus oxycedrus</i> ssp. <i>macrocarpa</i>		<i>Pinus pinea</i> Aiton		<i>Pinus pinaster</i>	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
<b>Gram-pozitivne bakterije</b>						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	576	576	1773	1773	2623,5	5247
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	72	>288	443,2	1773	655,8	2623,5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	72	288	221,6	886,5	5247,2	20988
<i>Bacillus cereus</i>	144	576	221,6	443,25	1311,7	2623,5
<i>Clostridium perfringens</i>	288	1152	443,25	443,25	5247	10494
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	72	72	27,7	27,7	655,8	1311,7
<i>Micrococcus luteus</i>	576	2304	1773	1773	1311,7	2623,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	72	72	221,6	886,5	655,8	2623,5
<b>Gram-negativne bakterije</b>						
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	576	576	1773	1773	5247	5247
<b>Gljivice</b>	<b>MIK<sub>50</sub></b>	<b>MIK<sub>90</sub></b>	<b>MIK<sub>50</sub></b>	<b>MIK<sub>90</sub></b>	<b>MIK<sub>50</sub></b>	<b>MIK<sub>90</sub></b>
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	72	144	221,6	443,25	655,8	1311,7
<i>Aspergillus niger</i>	18	72	55,4	110,8	163,9	655,8

Metodom mikrodilucije se određuje minimalna inhibitorna koncentracija, a to je najniža koncentracija u našem slučaju eteričnog ulja koja sprječava rast bakterija. Koncentracija ispitivanog ulja koja se nalazi u prvoj jažici, u kojoj nema porasta bakterija, se naziva minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i izražava se  $\text{mg L}^{-1}$  ili  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Minimalna baktericidna koncentracija (MBK) je najniža koncentracija ispitivanog ulja koja ubija određenu bakteriju. Izražava se također u  $\text{mg L}^{-1}$ . MBK je u pravilu veća od MIK vrijednosti do 32 puta, te ako je omjer MIK/MBK veći od 32, govori se o toleranciji bakterije na ulje. Također MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> označavaju najmanju inhibicijsku koncentraciju, odnosno najnižu koncentraciju eteričnog ulja koja je potrebna da spriječi rast gljivica za 50 %, odnosno 90 %.

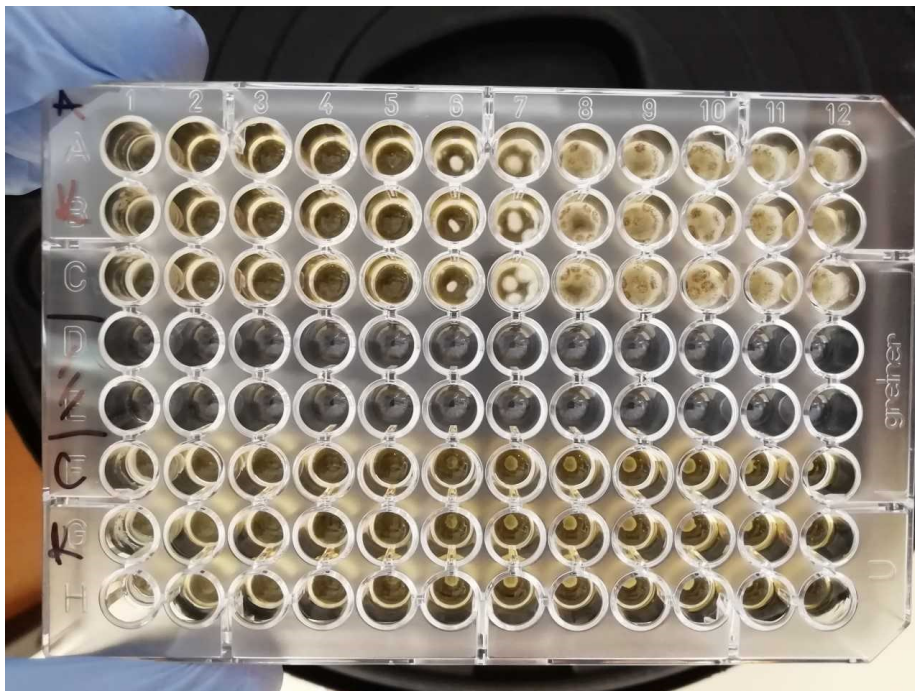
Iz tablice je vidljivo da eterična ulja iz iglica pinja, primorskog bora i pukinje imaju različitu antimikrobnu aktivnost na testirane patogene mikroorganizme. Eterično ulje pukinje pokazalo je najširi spektar antimikrobne aktivnosti, s MIK vrijednošću ispod  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  protiv bakterija *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* i *S. pneumoniae* te obje vrste gljivica. Gledajući antimikrobnu aktivnost ulja prema pojedinoj vrsti mikroorganizama, najbolji rezultat pokazalo je eterično ulje pinja kojemu su određene vrijednosti za MIK i MBK od  $27,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  za bakteriju *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. S druge strane, gljivice su pokazale najveću osjetljivost na eterično ulje pukinje (MIK<sub>50</sub>  $18 \mu\text{g mL}^{-1}$  za *A. niger*, te  $72 \mu\text{g mL}^{-1}$  za *C. albicans*).

*Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa* je pokazao dobru antimikrobnu aktivnost za pojedine sojeve gram-negativnih bakterija: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (MIK =  $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MBK =  $>288 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (MIK =  $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MBK =  $288 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (MIK = MBK =  $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Streptococcus pneumoniae* (MIK = MBK =  $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Gram-negativne bakterije su općenito rezistentnije, te su za *Escherichiu coli* ATCC 25922 vrijednosti MIK-a i MBK-a iznosile  $576 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Za gljivice je pukinja pokazala dobre rezultate: *Candida albicans* ATCC 90029 (MIK<sub>50</sub> =  $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MIK<sub>90</sub> =  $144 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), te za *Aspergillus niger* MIK<sub>50</sub> =  $18 \mu\text{g mL}^{-1}$  i MIK<sub>90</sub> =  $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

*Pinus pinea* L. je imala kod gram-pozitivnih bakterija samo jednu dobru antimikrobnu aktivnost, i to za *Listeriu monocytogenes* ATCC 19111 gdje je MIK = MBK =  $27,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Kod predstavnika gram-negativnih bakterija je pokazala lošu antimikrobnu aktivnost. Za *Escherichiu coli* ATCC 25922 MIK i MBK vrijednosti su iznosile  $1773 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Kod

gljivica je najbolju antimikrobnu aktivnost pokazala za *Aspergillus niger*, gdje je  $MIK_{50}$  iznosila  $55,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $MIK_{90}$  je bio  $110,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

*Pinus pinaster* Aiton je pokazao najnižu antimikrobnu aktivnost i za gram-pozitivne, i gram-negativne bakterije, te za gljivice. Najveću antimikrobnu aktivnost kod gram- pozitivnih bakterija je bila za *Listeriu monocytogenes* ATCC, gdje je MIK iznosio  $655,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A MBK je bio  $1311,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Za *Escherichiu coli* ATCC 25922 MIK i MBK vrijednosti su iznosile visokih  $5247 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Kod gljivica najbolji rezultat je pokazao protiv *Aspergillus niger* ( $MIK_{50} = 163,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $MIK_{90} = 655,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Slika 29.** *Aspergillus niger* (gornja tri reda, ABC) i *Candida albicans* (donja tri reda, FGH) testirani na primorskom boru

## 4. ZAKLJUČAK

Eterična ulja pinja, primorskog bora i pukinje su izolirana u aparaturi po Clevengeru. Eterična ulja su potom analizirana vezanim sustavom GC-MS te je određen kemijski sastav eteričnih ulja.

Najzastupljeniji spoj u eteričnom ulju pinja je monoterpen limonen (42,57 %), a od seskviterpena najzastupljeniji su bili *trans*-kariofilen (6,69 %), te guaiol (5,87 %).

U eteričnom ulju primorskog bora najzastupljeniji spoj je monoterpen  $\alpha$ -pinen (28,52 %), te seskviterpeni germakren D (21,31 %) i *trans*-kariofilen (15,56 %).

Kod eteričnog ulja pukinje monoterpen  $\alpha$ -pinen je također najzastupljeniji spoj (64,85 %), od ostalih spojeva najveći postotak zauzimaju još seskviterpen  $\gamma$ -murolen (5 %), i diterpen tunbergol (5 %)

Antioksidacijska aktivnost svih ulja ispitana je metadama DPPH i FRAP. Koristeći DPPH metodu pri najvećoj testiranoj koncentraciji (22,72  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ulja su pokazala vrlo slabu ili nikakvu aktivnost. Kod primjene FRAP metode ulja (testirana pri najvišim koncentracijama) su pokazala nešto bolju aktivnost (i to od 374 - 454  $\mu\text{mol}$  ekvivalenta  $\text{Fe(II)L}^{-1}$ ). Iz mavedenog je ustanovljeno da ulja ne pokazuju značajnu antioksidacijsku aktivnost.

Ispitana je sposobnost ulja da inhibiraju enzime acetil- i butirilkolinesterazu. Eterična ulja primorskoga bora i pukinje su pokazala dobru sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze sa  $\text{IC}_{50}$  vrijednostima, redom, 13,64 i 18,18  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dok se  $\text{IC}_{50}$  vrijednost za eterično ulje pinja nije mogla izračunati.

Sva tri eterična ulja su pokazala slabiju sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze. Eterična ulja pukinje i primorskog bora pokazala su sličnu inhibicijsku aktivnost, redom, 35,90 % i 35,10 % pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 22,72  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Eterično ulje pinja je pokazalo 23,88 % inhibicijske aktivnosti pri koncentraciji 17,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Metodom mikrodilucije određeno je i antimikrobno djelovanje svim eteričnim uljima je određeno i to na osam gram-pozitivnih sojeva bakterija, te na jednu gram-negativnu i na dvije vrste gljivica.



Općenito, ulja su pokazala bolje antifungalno djelovanje. Najšire antimikrobno djelovanje pokazalo je eterično ulje pukinje s MIK vrijednostima ispod  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  i to protiv bakterija *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* i *S. pneumoniae* te obje vrste gljivica.

Najbolje antibakterijsko djelovanje pokazalo je eterično ulje pinja i to prema bakteriji *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 sa MIK i MBK vrijednostima od  $27,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Najbolje antifungalno djelovanje pokazalo je eterično ulje pukinje za obje vrste gljivica (MIK<sub>50</sub>  $18 \mu\text{g mL}^{-1}$  za *A. niger*, te  $72 \mu\text{g mL}^{-1}$  za *C. albicans*).

## LITERATURA

1. URL:<https://hr.wikipedia.org/wiki/Borovke> (pristupljeno: 09.kolovoza 2019.)
2. URL:<https://www.plantea.com.hr/pinija/> (pristupljeno: 09.kolovoza 2019.)
3. URL:[http://cdn.shopify.com/s/files/1/1618/6763/products/Pinus-pinea-II\\_1200x1200.png?v=1542954826](http://cdn.shopify.com/s/files/1/1618/6763/products/Pinus-pinea-II_1200x1200.png?v=1542954826) (pristupljeno: 09.kolovoza 2019.)
4. URL:<https://www.plantea.com.hr/primorski-bor/> (pristupljeno: 09.kolovoza 2019.)
5. URL:<https://i.pining.com/originals/a2/db/b9/a2dbb9686fe0c31ad45746fcdf05679f.jpg> (pristupljeno: 09.kolovoza 2019.)
6. URL:<https://hr.wikipedia.org/wiki/%C4%86mpresovke> (pristupljeno: 19.kolovoza 2019.)
7. URL:<https://www.luminescents.net/wp-content/uploads/2014/05/cade-botanical-print.jpg> (pristupljeno: 20.kolovoza 2019.)
8. URL:<https://www.plantea.com.hr/pukinja/> (pristupljeno: 20.kolovoza 2019.)
9. I. Jerković, I. Blažević, Kemija i tehnologija aromatičnog bilja, nerecenzirana interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2018.
10. M. Subotić, Terpeni-prirodni organski spojevi, završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayer u Osijeku, Osijek, 2016.
11. W. Wu, W. Tran, C. A. Taatjes, J. Alonso-Gutierrez, T. S. Lee, J. M. Gladden (2016) Rapid Discovery and Functional Characterization of Terpene Synthases from Four Endophytic Xylariaceae. PLoS ONE 11(2): e0146983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146983>
12. I. Komušanac, Utjecaj postupka ekstrakcije na iskorištenje i kemijski sastav eteričnog ulja konopljike (*Vitex agnus castus* L.), diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište J. J. Strossmayer u Osijeku, Osijek, 2016.
13. URL:<https://www.plantagea.hr/aromaterapija/ugljikovodici/> (pristupljeno: 23.kolovoza 2019.)
14. K. Poljanec, Proizvodnja biljnih ekstrakata, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2017.

15. URL: [https://www.veleri.hr/files/datotekep/nastavni\\_materijali/k\\_vinarstvo\\_3/Destilacija\\_et.ulja\\_Neo\\_Clevenger.pdf](https://www.veleri.hr/files/datotekep/nastavni_materijali/k_vinarstvo_3/Destilacija_et.ulja_Neo_Clevenger.pdf) (pristupljeno: 24.kolovoza 2019)
16. F. Burčul, Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2014.
17. URL: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=39268> (pristupljeno: 24.kolovoza 2019)
18. A.-H. M. Emwas, Z. A. Al-Talla, Y. Yang, N. M. Kharbatia (2015) Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. In: Bjerrum J. (eds) Metabonomics. Methods in Molecular Biology, vol 1277. Humana Press, New York, NY,
19. URL: <http://www.belupo.ba/Default.aspx?sid=4763> (pristupljeno: 25.kolovoza 2019.)
20. URL: <http://static.zena.hr/upload3/Antioksidansi%202.jpg> (pristupljeno: 25.kolovoza 2019.)
21. T. Živko, Određivanje antioksidativnog učinka, ukupnih fenola i tanina u plodu rogača, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb, 2012.
22. I. Ahac, Optimiranje koagulacijske predobrade sirove vode bogate prirodnim organskim tvarima, Diplomski rad, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu Zagreb, 2015.
23. K. Pregiban, Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti, Završni rad, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2017.
24. M. Miklić Bubić, Usporedba djelovanja trajne infuzije i pojedinačnih doza rokuronija u anesteziji za lumbalnu diskektomiju na mišićnu snagu i kvalitetu oporavka bolesnika, 2018, Doktorska disertacija, Zagreb
25. I. Božić, Određivanje antioksidacijske aktivnosti i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza nehlapljivih izolata korijena gaveza, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Split, 2018.
26. M. Dvorščak, Inhibitorni učinak alkaloida iz biljne vrste *Corydalis cava* (L.) Schweigg.& Körte na acetilkolinesterazu, Diplomski rad, Farmaceutski- biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2017.

27. URL:[https://hr.wikipedia.org/wiki/Alzheimerova\\_bolest](https://hr.wikipedia.org/wiki/Alzheimerova_bolest) (pristupljeno: 29. kolovoza 2019.)
28. V. Bušić, Nove ekološki prihvatljive metode kvaternizacije derivata piridina, Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij, Molekularne bioznanosti, Osijek, 2015.
29. URL:<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0367-598X/2011/0367-598X1100051S.pdf> (pristupljeno: 29.kolovoza 2019.)
30. J. S. Stojanović, Uticaj primenjene metode i rastvarača na rezultate antimikrobnog testiranja, Master rad, Univerzitet u Nišu, Niš, 2016.
31. URL:<https://sr.wikipedia.org/sr-el/Антибиограм> pristupljeno 03.09
32. S. Kaleuić i suradnici, Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb 2013.
33. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus\\_luteus](https://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_luteus) pristupljeno 03.09.
34. URL: <https://thenativeantigencompany.com/products/mouse-anti-listeria-monocytogenes-lzh1/> pristupljeno: 23.10.
35. URL: <https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26315/Escherichia-coli.html> pristupljeno 23.10.
36. URL: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Aspergillus-niger.aspx>