# SASTAV ETERIČNOG ULJA BILJAKA RODA Micromeria, VRSTE Micromeria juliana (L.) BENTH. EX RCHB. I VRSTE Micromeria kerneri (MURB.) S LOKALITETA PIJAVIČINO, POLUOTOK PELJEŠAC

**Mušan, Nikola**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:070327

*Rights / Prava:* Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

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

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Science









Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Nikola Mušan

# SASTAV ETERIČNOG ULJA BILJAKA RODA *Micromeria*, VRSTE *Micromeria juliana*(L.) Benth. I VRSTE *Micromeria kerneri* (Murb.) S LOKALITETA PIJAVIČINO, POLUOTOK PELJEŠAC

Diplomski rad

Split, 2016.

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Nikola Mušan

# SASTAV ETERIČNOG ULJA BILJAKA RODA *Micromeria*, VRSTE *Micromeria juliana*(L.) Benth. I VRSTE *Micromeria kerneri* (Murb.) S LOKALITETA PIJAVIČINO, POLUOTOK PELJEŠAC

Diplomski rad

Split, 2016.

Ovaj rad, izrađen u Splitu 2016. godine, pod vodstvom izv. prof. dr.sc. Valerije Dunkić, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja magistar edukacije biologije i kemije.

**Zahvala**

Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr.sc. Valeriji Dunkić na pomoći prilikom izrade mog diplomskog rada, roditeljima i obitelji na financijskoj i moralnoj podršci i kolegici Rakušić što je uvijek bila uz mene.

SAŽETAK

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju

Diplomski rad

# SASTAV ETERIČNOG ULJA BILJAKA RODA *Micromeria*, VRSTE *Micromeria juliana*(L.) BENTH. EX RCHB. I VRSTE *Micromeria kerneri* (MURB.) S LOKALITETA PIJAVIČINO, POLUOTOK PELJEŠAC

NIKOLA MUŠAN
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split

Tema ovog diplomskog rada je analiza sastava dviju biljnih vrsta iz roda *Micromeria.* Taj rod spada u porodicu usnača *(Lamiaceae)* zbog čega ima karakterističan cvat. Na listovima vrsta *Micromeria kerneri* i *Micromeria juliana* nalaze se žljezdane dlake koje stvaraju sekundarne metabolite. Provedena je analiza eteričnog ulja biljaka s lokaliteta Pijavičino i rezultati su prikazani pomoću kromatograma, tablice s spojevima i grafičkog prikaza. Najzastupljeniji spojevi u sastavu eteričnog ulja ovih biljaka su seskviterpenski hidrokarbonati i oksigenirani seskviterpeni. Temeljem rezultata utvrđena je srodnost ovih dviju biljnih vrsta.

64 stranice/LIV stranica, 28 slika, 2 tablice, 44 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 33, Split

Ključne riječi: Eterično ulje / monoterpeni / seskviterpeni / *Micromeria juliana* / *Micromeria kerneri*

Voditelj: izv. prof. dr.sc. Valerija Dunkić

Ocjenitelji: izv. prof. dr.sc. Valerija Dunkić, prof. dr.sc. Nada Bezić, doc. dr.sc. Mirko Ruščić

Rad prihvaćen: 11.07.2016.

ABSTRACT

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

**THE OIL COMPOSITION OF *Micromeria* PLANTS, *Micromeria juliana* (L.) BENTH. EX RCHB. AND *Micromeria kerneri* (Murb.) AT THE LOCATION OF PIJAVIČINO, PELJEŠAC PENINSULA**

NIKOLA MUŠAN
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split

The theme of this paper is the analysis of two species in the genus Micromeria. The genus is a part of the Lamiaceae family, giving it the characteristic inflorescence. The leaves of *Micromeria kerneri* and *Micromeria juliana* contain glandular hairs that produce secondary metabolites. An analysis of the oil composition of plants from location of Pijavičino has been conducted and the results are shown as chromatograms, tables and charts. The most common compounds in the oil compostion of these two plants were sesquiterpenic hydrocarbonates and oxygenated sesquiterpenes. Based on the results of this research, cognation of these plants has been justified.

64/LIV pages, 28 figures, 2 tables, 44 references, original in: Croatian

Thesis deposited in Library of Faculty of Science, Ruđera Boškovića 33, Split, Croatia

Keywords: Essential oil / monoterpenes / sesquiterpene / *Micromeria kerneri* / *Micromeria juliana*

Supervisor: PhD Valerija Dunkić, associate professor

Reviewers: PhD Valerija Dunkić, associate professor, PhD Nada Bezić, professor, PhD Mirko Ruščić, professor

Thesis accepted: 11.07.2016.

# Sadržaj

1.UVOD ..... 1

2. OPĆI DIO ..... 2

2.1. Botanička pripadnost vrste *Micromeria juliana* (L.) ..... 2

2.2. Botanička pripadnost vrste *Micromeria kerneri* (Murb.) ..... 3

2.3. Porodica *Lamiaceae* ..... 4

2.3.1. Morfološka obilježja porodice Lamiaceae ..... 4

2.4. Morfološka svojstva roda *Micromeria* ..... 5

2.6. Ekološka i morfološka svojstva vrste *Micromeria kerneri* (Murb.) ..... 6

2.7. Trihomi ..... 7

2.7.1. Nežljezdane dlake ..... 8

2.7.2. Žljezdane dlake ..... 9

2.8. Sekundarni metaboliti ..... 10

2.8.1. Eterična ulja ..... 12

2.8.2. Terpenski spojevi ..... 15

2.8.3. Biosinteza terpenskih spojeva ..... 16

2.8.4. Monoterpeni ..... 19

2.8.5. Seskviterpeni ..... 23

2.9. Eterična ulja roda *Micromeria* ..... 25

2.9.1. Klimatski uvjeti Pijavičino, poluotok Pelješac ..... 26

3. Materijal i metode ..... 27

3.1. Sakupljanje materijala ..... 27

3.2. Izolacija eteričnih ulja vrsta *Micromeria juliana* (L.) i *Micromeria kerneri* (Murb.) ... 27

3.3.GC/MS i GC/FID analiza eteričnog ulja ..... 28

4. Rezultati istraživanja ..... 29

4.1. Sastav eteričnog ulja vrste *Micromeria kerneri* (Murb.) ..... 29

4.2. Sastav eteričnog ulja vrste *Micromeria juliana* (L.)..... 33

5. Rasprava..... 37

6. Zaključak..... 40

7. Literatura..... 42

# 1.UVOD

Rod *Micromeria* (Bentham, 1829.), rasprostranjen je od mediteranske regije do sjeverne Afrike, Indije i Kine. Ovaj rod pripada porodici usnjača *Lamiaceae* i redu Lamiales. Također se svrstava u odjeljak sjemenjača (Spermatophyta). Rod *Micromeria* je polimorfan rod porodice Lamiace što znači da različite vrste roda imaju i različita morfološka obilježja. U Hrvatskoj postoji devet vrsta iz roda *Micromeria,* a to su: *Micromeria croatica* (Pers.) Schott, *Micromeria dalmatica* Benth., *Micromeria fruticulosa* (Bertol.) Šilić, *Micromeriagraeca* (L.) Rchb., *Micromeria juliana* (L.) Benth. Ex Rchb., *Micromeria kerneri* Murb., *Micromeria microphylla* (d'Urv.) Benth., *Micromeria pseudocroatica* Šilić, *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch. Posljednjih godina je proveden niz morfoloških i molekularnih studija roda *Micromeria* kao i srodnih rodova. Posljedica toga je značajna promjena genetičkih temelja roda. Tako su nedavne molekularne analize pokazale da je rod *Micromeria* polifilan te da su članovi sekcije *Pseudomelissa* blisko srodni rodu *Clinopodium*. Zbog toga su 2006. godine vrste roda *Micromeria* sekcije *Pseudomelissa* prebačeni u rod *Clinopodium*, gdje i pripadaju zbog morfoloških karakteristika. (Arabaci et al. 2010.) Unutar roda *Micromeria* nema prihvaćenih sekcija, a sam rod uključuje oko 54 prihvaćene vrste sa 32 podvrste i 13 varijeteta. Ovi će se podaci u bliskoj budućnosti vjerojatno mijenjati jer mnoge novootkrivene vrste još nisu opisane, a kod najmanje 15 vrsta pripadnost rodu je dvojbena. Stoga je potrebna infraspecifična klasifikacija te temeljita revizija novih podataka (Baytop i sur. 1984.). Pripadnici roda *Micromeria* su mali, razgranjeni, vazdazeleni polugrmovi, visine 30-40 cm, sitnih tamozelenih listova koji sjede na mnogobrojnim uspravnim i nerazgranatim stabljikama. Donji listovi su jajasti, a gornji linearni uvijenih rubova. Cvjetovi su promjera do 5 mm po čemu je ovaj rod i dobio ime (grč. *Mikros* = malen, *meris* = dio). Cvjetovi su sitni i sjedeći, svijetlo ljubičaste, crvenkaste ili bijele boje s 4 prašnika. Čaška je pravilna sa 5 jednakih zubaca i 13-15 žila. Cvjetovi su skupljeni u pršljenima, većinom zbijenih na vrhovima stabljika, cvate od svibnja do kolovoza. Plod je kalavac koji se raspada na 4 ploda (Kovačić i sur. 2008.). U ovom diplomskom radu smo izolirali eterična ulja iz biljaka *Micromeria juliana* i *Micromeria kerneri* s lokaliteta Pijavičino poluotok Pelješac, da bismo usporedili sastav ulja ovih dviju srodnih vrsta, koristeći GC/FID i GC/MS kromatografske analize. Istraživanja obavljena u ovom diplomskom radu doprinose boljem razumjevanju

taksonomskog položaja roda *Micromeria*i upotpunjuju fitokemijski prikaz hrvatskih *Micromeria.*

# 2. OPĆI DIO

## 2.1. Botanička pripadnost vrste *Micromeria juliana* (L.)

Sistematski položaj istraživane vrste je sljedeći:

Odjeljak: Spermatophyta (sjemenjače)

Pododjeljak: Magnolyophitina (kritosjemenjače)

Razred: Magnoliatae (dvosupnice)

Podrazred: Asteridae (dvosupnice)

Nadred: Lamianae

Red: Lamiales

Porodica: *Lamiacae* (usnjače)

Rod: *Micromeria*

Vrsta: *Micromeria juliana* (L.)

Mjesto objavljivanja: Oesterr. Bot. Wochenbl. 7: 93 (1857)

Autori svojte: 1. Christiaan Hendrik Persoon

2. Heinrich Wilhelm Schott

Narodno ime: Julijska bresina (Hr), Domac, R., 1994.

Julijski vrisić (Hr), Šilić, Č., 1984.

## 2.2. Botanička pripadnost vrste *Micromeria kerneri* (Murb.)

Sistematski položaj istraživane vrste je sljedeći:

Odjeljak: Spermatophyta (sjemenjače)

Pododjeljak: Magnolyophitina (kritosjemenjače)

Razred: Magnoliatae (dvosupnice)

Podrazred: Asteridae (dvosupnice)

Nadred: Lamianae

Red: Lamiales

Porodica: Lamiaceae (usnjače)

Rod: *Micromeria*

Vrsta: *Micromeria kerneri* Murb.

Mjesto objavljivanja: Acta Univ. Lund 27(5): 53 (1891)

Autor vrste: Svante Samuel Murbeck

Sinonimi: Satureja kerneri (Murb.)

Narodno ime: Kernerova bresina (Hr), Domac R., 1994.

## 2.3. Porodica *Lamiaceae*

Obuhvaća oko 3500 vrsta rasprostranjenih u cijelom svijetu, a najviše u Sredozemlju jer vole toplu klimu i vapnenačku podlogu.Većinom su aromatične biljke koje eterično ulje izlučuju u brojnim žljezdanim dlakama i žlijezdama tipa Labiatae koje prekrivaju stabljiku, listove i cvjetove.

Neke se vrste zbog bogatstva aromatičnim uljima upotrebljavaju kao začini u kulinarstvu ili kao ljekovito bilje, npr. mažuran (*Majorana hartensis*), origano (*Origanum vulgare*), bosiljak (*Ocimum basilicum*), ružmarin (*Rosmarinus officinalis*), lavanda (*Lavandula officinalis*), majčina dušica (*Thymus vulgaris*), ljekovita kadulja (*Salvia officinalis*), metvica (*Mentha piperita*) i dr. (www.kormofita-16-nikolic.hr).

### 2.3.1. Morfološka obilježja porodice Lamiaceae

Stabljika je četverobridna (radi kolenhima koji se nalazi u „kutovima“ stanica) a listovi su cjeloviti, nasuprotni, prekriveni dlakama te sadrže žljezde koje proizvode eterična ulja. Cvjetovi su jednosimetrični, dvospolni, ocvijeće peteročlano. Lamiacae spadaju u sulatičnice, tj. biljke sa sraslim ocvijećem. Čaška je srasla od pet lapova, a vjenčić od pet latica. Na cjevastom vjenčiću razlikujemo gornju usnu (nastala sraštavanjem dviju latice) i donju usnu (nastala sraštavanjem triju latice). Ako je gornja usna zakržljala, cvijet je jednousnat. Prašnika ima 4 (izuzetak su kadulja i ružmarin po 2), od kojih su dva dulja. Prašnici su filamentima srasli za vjenčić. Antere su međusobno paralerne ili se vrhovima približavaju, ili pak razilaze, što je značajno pri determinaciji vrste. Plodnica je nadrasla, srasla od dva plodna lista. Plod je sitni cijepavac koji se raspada na 4 suha oraščića (Kovačić et al.,2008).

Za porodicu su karakteristična brojna i po fitokemijskom sastavu raznolika eterična ulja (kao dominantne komponente nalazimo mentol, timol, karvakrol, cineol, linalol, nereol, borneol, jasmon, geraniol i mnoge druge) zbog kojih se mnoge vrste ove porodice koriste kao začinsko i ljekovito bilje.

## 2.4. Morfološka svojstva roda *Micromeria*

Vrste roda *Micromeria* su mali, razgranjeni polugrmovi, slični onima iz roda *Thymus*, često su dlakavi i mirisni. Listovi su sitni, široko jajasti ili okruglasti ili kopljasti do linearni, manje-više savinutog ruba. Cvjetovi su sjedeći ili na kratkim stapkama, crvene, ljubičaste, blijedo ljubičaste ili bijele boje. Cvjetovi su im sakupljeni u rastresite prividne metlice ili grade dugačak isprekidan grozd. Čaške su cjevaste ili cjevasto – zvonaste, pravilne sa 5 jednakih ili gotovo jednakih ušiljenih zubaca i s 13-15 uzdužnih žila. Čaška je aktinomorfna i ravna, odnosno zigomorfna i malo svinuta, rjeđe trbušasto proširena, slabije dvousnata s prilično nejednakim zupcima, u ždrijelu gola ili dlakava (Chater i Guinea, 1972.). Ogranci vrata tučka su podjednaki, šiljasti prašnici su zakrivljeni, divergentni, kraći od vjenčića i ima ih najviše 4. Vjenčić i prašnici slični su kao u roda *Satureja.* Vjenčić je dvousan s plosnatom gornjom i trolapom donjom usnom. Pod gornjom usnom se nalaze 4 dvomočna prašnika koja ne izviru iz vjenčića. Plodovi poput oraščića su vretenasti ili jajasto vretenasti, pretežno tamnosmeđe boje, goli ili samo pri vrhu s čuperkom dlačica (Kalogjera i Jurišić, 1998.).



Slika 1. Rod *Micromeria graeca* (Izvor: bib.irb.hr).

2.5. Ekološka i morfološka svojstva vrste *Micromeria juliana* (L.)

Vrsta *Micromeria juliana* (L.) je niski zeleni polugrm visine 10 do 40 cm, sa brojnim, uspravnim i dlakavim stabljikama. Listovi su dužine 3-8 cm, a širine 1-2.5 mm. Donji listovi su ovalni, srednji lancelasti, a gornji usko lancelasti, paralelnih rubova. Mali crveni cvjetovi smješteni u zbijenim račvicama čine isprekidan grozd. Čaška je usko zvonastva, sivo zelena, 2,5-3,5 mm duga, izvana dlakava, a zupci su upola dugi kao cijev čaške. Vjenčić je ljubičaste boje, samo izvana dlakav i oko 5 mm dug. Rasprostranjena je na području Portugala, Korzike, Krete, Italije, Sicilije, Hrvatske, Albanije, Crne gore, Makedonije, Bugarske i Grčke (Chater i Guinea, 1972.).



Slika 2. Vrsta *Micromeria juliana* u cvatu (Izvor: www.actaplantarum.org)

2.6. Ekološka i morfološka svojstva vrste *Micromeria kerneri* (Murb.)

*Micromeria kerneri* je otporni poluendem primorskih Dinarida: velebitsko primorje, dalmatinska Zagora, Hercegovina, Boka Kotorska, pa vršne stijene na brdima jugoistočnog Krka i južne klisure susjednog Prvića. Raste na otvorenim, suhim i izložnim stijenama,

najčešće u zajednici *Micromerio-Inuletum methanaeae*. *Micromeria kerneri* Murb. je jednogodišnja, zeljasta, vrlo razgranata i mirisna, oko 30 – 40 cm visoka biljka. Stabljika je četverobridna sa malim žljebovima. Listovi su sitni, sjedeći, cjeloviti i dlakavi. Dlake strše na stabljici. Cvatovi su jednako dugi ili dulji od lista. Cvjetovi su hermafroditi, od 6 do 10 poredani u prividni pršljen, u sjedećim, pazušnim parovima. Čaška je u ždrijelu rijetko dlakava. Korola je ljubičasta i duga 3-4 mm (Domac, 1994).



Slika 3. Vrsta *Micromeria kerneri*, listovi i dlačice (Izvor: Semir Maslo, 2013.)

## 2.7. Trihomi

Trihomi (grč. trihos – dlaka) su tvorevine inicijalne epidermalne stanice tj. meristema. Glavna je podjela trihoma na nežljezdane i žljezdane trihome. Nežljezdane se dlake dijele prema svojoj morfologiji, a žlijezdane i prema sekrecijskom materijalu koji izlučuju, akumuliraju ili apsorbiraju (Bezić, 2008; Hallahan i sur., 2000).

Po obliku razlikujemo sedam vrsta nežljezdanih i žljezdanih dlaka:

- papile

- jednostavne (nerazgranate, kratke i duge)
- sastavljene od dvije do pet grana (u obliku slova J, T, U, V,Y)
- zvjezdaste (kružne, višekutne)
- stepenične (ljuskaste)
- razgranate
- specifični tipovi

Jednostanične dlake (papilozne, cjevaste, šiljaste) nastaju većim ili manjim produženim rastom inicijalne stanice dok višestanične dlake nastaju nizom uzastopnih dioba, a mogu biti razgranate ili nerazgranate. Uloga dlaka je zaštita od pretjerane transpiracije, termoizolacija i mehanička zaštita. U dlakavom omotaču stvara se zavjetrina oko lista u kojem se zadržava vodena para. Ta pojava izaziva zatvaranje puči i smanjuje se transpiracija biljaka suhih i tropskih staništa. Dlake mogu štititi biljku od kukaca i drugih životinja izlučujući otrovni ili nadražujući sadržaj. Takve dlake nazivamo emergencijama, a razlikuju se od ostalih i prema nastanku. Naime, nastaju diobom nekoliko inicijalnih stanica. Iz emergencija, nakon odlamanja nježnog vrška, izlazi sadržaj bogat natrijevim formijatom, acetil-kolinom i histaminom. Neke dlake, najčešće glavičaste, sadrže mirisna eterična ulja, smole, sluzi i druge metabolite. Funkcija mnogih trihoma nije u potpunosti poznata, a mnoge hipoteze vezane za trihome nisu eksperimentalno dokazane. Funkcija nežljezdanih dlaka ovisi o njihovoj morfologiji, o organima uz koje je smještena i orijentaciji. Žljezdane dlake imaju također različite funkcije ovisno o lokaciji, vremenu aktivacije i sekreciji. Funkcije trihoma mogu se podijeliti na sljedeće: zaštitna, upijanje vode, uloga u izlučivanju soli (hidatode), privlačenje kukaca (nektarije) i lokacijsko-zavisne funkcije trihoma cvjetova, plodova i sjemena (Hallahan i sur., 2000).

### 2.7.1. Nežljezdane dlake

Mrtve dlake sastoje se od uginulih stanica, redovito su ispunjene zrakom i bijele boje zbog refleksije svjetlosnih zraka. Mrtve su nužno, a ne slučajno. Kad bi imale vlažan živi sadržaj, transpiracijska bi se površina biljke znatno povećala, a samim time povećalo bi se i isparavanje. Osim toga, ove dlakave prevlake ne dopuštaju sunčevim zrakama da padaju izravno na epidermu, koja se zbog toga manje zagrijava pa se na taj način smanjuje transpiracija. Ovakvi se trihomi u velikom broju nalaze kod biljaka suhih klimatskih predjela (Potočić, 1980). Nežljezdane dlake se razlikuju morfološki, anatomski i mikrostrukturno, ali

se osnovna klasifikacija temeljena na morfologiji. Mogu biti jednostanične i višestanične, razgranjene ili nerazgranjene. Nerazgranjene višestanične nitaste dlake mogu biti jednoserijske, biserijske ili multiserijske. Razlikuju se dužinom, brojem i staničnim oblikom, mogu biti simetrične ili asimetrične, širinom uniformne ili različite širine, a vršne stanice mogu biti zašiljene ili tupe (Hallahan i sur., 2000).

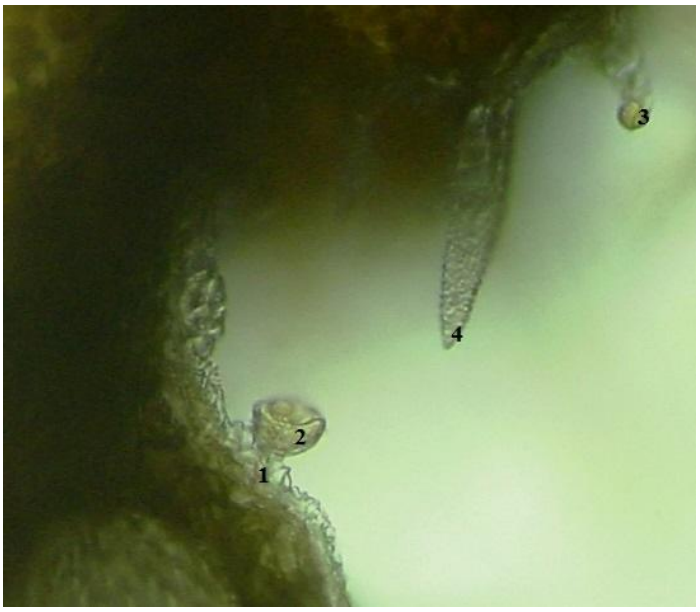
### 2.7.2. Žljezdane dlake

Sekrecijske dlake se često zovu samo žlijezde. One predstavljaju uređaje za izlučivanje krajnjih produkata izmjene tvari (sekreti) koje se odstranjuju iz protoplazme. Sekreti se nakupljaju u vakuolama ili intercelularima, ili se izlučuju izvan biljke. Ako sekreti ostaju unutar biljnog tkiva, zovemo ih unutrašnjim žlijezdama.

Brojne žljezdane dlake nalazimo npr. kod mnogih mirisnih biljaka, naročito kod porodice *Lamiaceae* (Rudall, 1992).

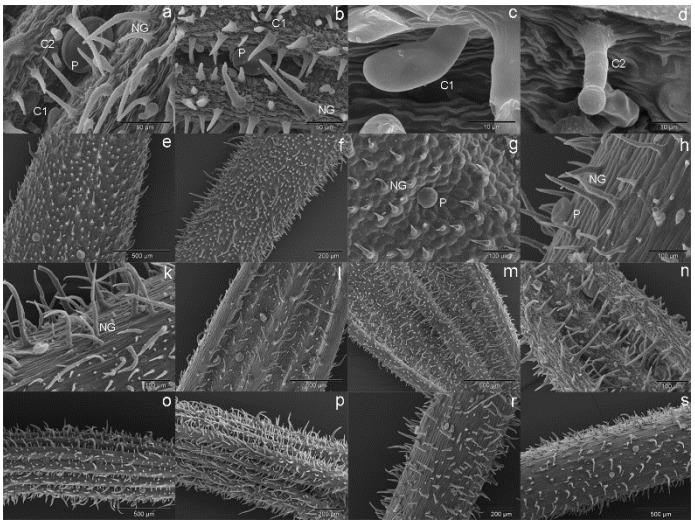
Za razliku od unutrašnjih žlijezda, vanjske žlijezde istiskuju sekret na površinu biljke. One se sastoje od:

- bazalne stanice
- jednoredne stapke sastavljene od jedne ili nekoliko stanica i glave jedne ili više sekrecijskih stanica (Fahn, 1990).




Slika 4. Poprečni prerez središnjeg dijela lista *M. kerneri* s trihomima (povećanje 40x).

Dijelovi glavičaste žljezdane dlake: 1 – bazalna stanica, 2- puknuta glavica; 3 – cjelovita žljezdana glavica; 4 – nežljezdana dlaka (preuzeto iz diplomskog rada Barkiđija, 2013)




Slika 5. Prikaz različitih vrsta trihoma

SEM mikroprikaz različitih vrsta trihoma vrste *Micromeria kerneri* (a, c, e, h, l, o, r) i *Micromeria juliana* (b, d, f, g, k, m, n, p, s). Nežljezdani trihomi (NG), štitasti trihomi (P), glavičasti trihome tip 1 (C1), glavičasti trihomi tip 2 (C2) i njihova raspodjela na adaksijalnoj (e, f, g) i abaxijalnoj površini lista (d, l, m, n) na vanjskoj strani čaške (a, b, c, o, p) i na stabiljici (h, k, r, s) (Kremer et al. 2014.)

## 2.8. Sekundarni metaboliti

Osim primarnih metabolita kao što su ugljikohidrati, aminokiseline, masne kiseline, citokromi, klorofil i metabolički intermedijeri anaboličkih i kataboličkih puteva koji se pojavljuju u svim biljakama, biljke također proizvode veliki spektar spojeva koji nemaju vidljivu funkciju u primarnom metabolizmu. Takve spojeve nazivamo sekundarnim metabolitima. Određeni sekundarni metaboliti ograničeni su na neke biljne vrste, ovisno o ekološkoj funkciji, kao što su privlašenje kukaca za prijenos peludi ili privljačenje životinja kako bi pojele sjeme i rasprostranile ga ili kao prirodni pesticid kako bi se obranile od herbivora i patogena (Heldt, 2011.). Sekundarni metaboliti razvili su se kao rezultat nasljednih mutacija, prirodne selekcije i evolucijskih promjena. Sekundarni produkti odlikuju

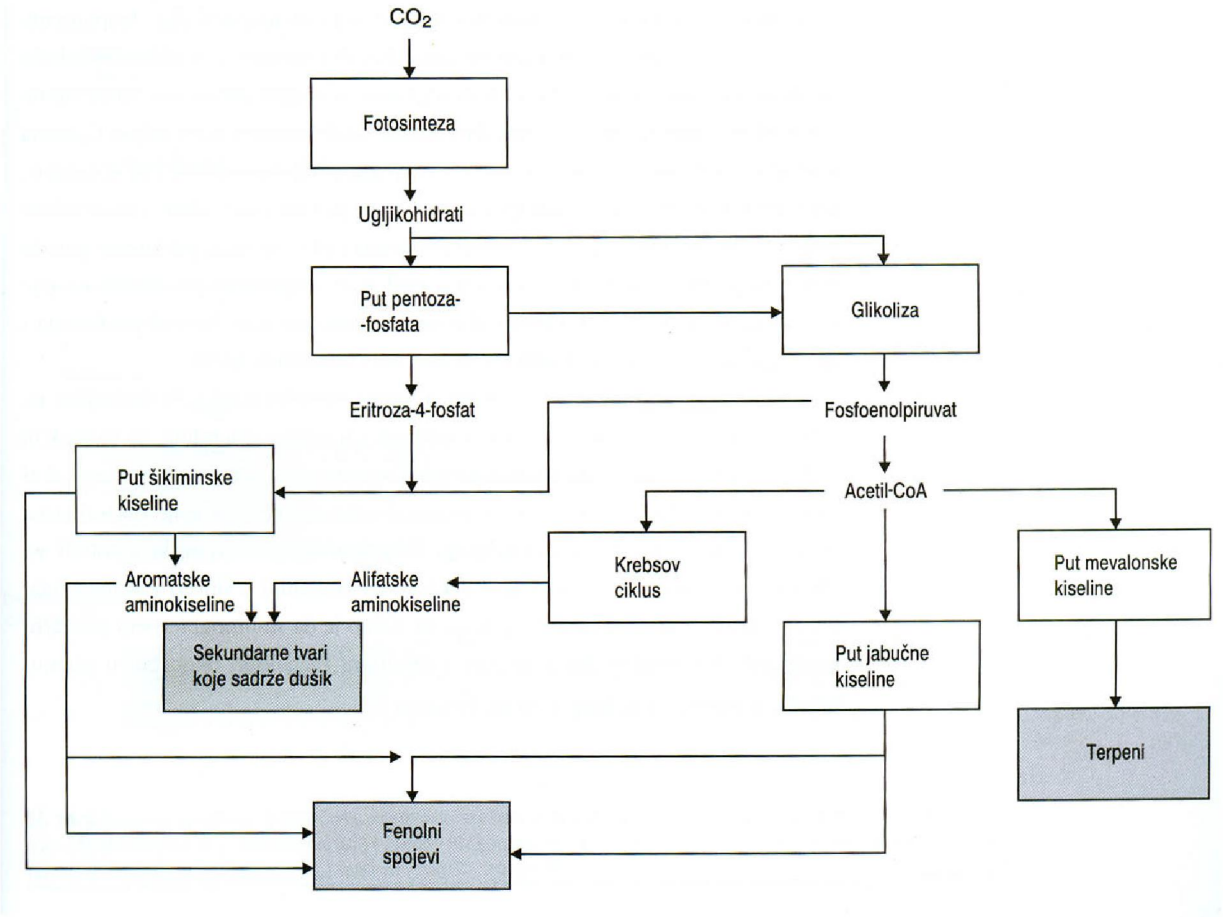
se i ograničenom raspodjelom u biljnom carstvu pa su često prisutni samo u jednoj biljnoj vrsti ili u skupini taksonomski srodnih vrsta. Sadržaj sekundarnih tvari u pojedinim organima, tkivima ili stanicama je različit i mijenja se tijekom razvitka, starenja i godišnjih doba. Na sadržaj utječe i opskrbljenost biljke hranjivim tvarima te stresni uvjeti. Biljka najčešće otpušta smjesu plinovitih sekundarnih produkata u vrijeme otvaranja cvjetova ili dozrijevanja plodova. Otpuštanje tih tvari usklađeno je sa dnevnom aktivnošću oprašivača ili rasprostranjivača plodova (www.agr.hr/cro).

Raspodjela sekundarnih obrambenih metabolita unutar biljne vrste ovisi o samoj biljci, vrsti metabolita, starosti biljke i o uvjetima okoliša. Tako su neki od fenola, alkaloida i većina tvari koja sadrži dušik pohranjeni u vakuolama, a sekundarni metaboliti slični lipidima, terpeni i nepolarni fenoli, nakupljaju se na mjestima izvan stanice (epidermski voskovi, žlijezdaste dlake i smolenice).

Sekundarni produkti se temeljem načina njihove biosinteze dijele u tri skupine:

- terpeni;
- fenolni spojevi;
- spojevi s dušikom

Terpeni su najveća skupina sekundarnih metabolita, netopivi su u vodi, a mogu biti otrovni za brojne kukce i sisavce. Sintetiziraju se iz acetil-CoA u putu mevalonske kiseline. Na temelju broja C5 jedinica dijele se na monoterpene, seskviterpene, diterpene, triterpene, tetraterpene i politerpene.
Fenolni spojevi su heterogena skupina spojeva koji sadrže OH skupinu na aromatskom prstenu. Topivi su u organskim otapalima ili u vodi. Sudjeluju u obrani od herbivora, mehaničkoj potpori, privlačenju oprašivača, kao i u redukciji rasta susjednih biljaka.
Sekundarne tvari koje sadrže dušik npr. alkaloidi sintetiziraju se iz alifatskih i aromatskih aminokiselina. Prisutni su u 20-30 % biljaka, a većina je otrovna za životinje te služe kao obrambene tvari. Kao sekundarni produkti javljaju se još i betacijani, betaksantini, kofein, nikotin, piperin, kapsacein, kinin i dr. (Slika 6).
Sekundarni metaboliti kutin, suberin i voskovi čine zaštitni sloj koji ograničava transpiraciju i pomaže biljci u očuvanju vode (www.pmf.unizg.hr).




Slika 6. Glavni putovi biosinteze sekundarnih metabolita, izvor (Pevalek-Kozlina, 2003)

### 2.8.1. Eterična ulja

Eterična ulja su prirodni produkti koji se mogu definirati kao hlapljive smjese različitih spojeva karakterističnog mirisa i okusa. Najčešće su to ugljikovodici, terpeni, benzenski derivati, alkoholi, aldehidi, esteri, ali i mnogi drugi spojevi koji pojedino ulje čine specifičnim. Količina eteričnog ulja se najčešće kreće između 1-2%, a u iznimnim slučajevima čak i do 20%. Najvažnije porodice koje proizvode eterična ulja sljedeće su: *Pinaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Lamiaceae i Apiaceae* (Lahlou, 2004). Nabrojene porodice su zastupljene u mediteranskoj flori i među biljnim vrstama ovih porodica nalaze se mnoge za farmaceutsku upotrebu važne vrste (Rudall, 1992; Wagner, 1993). Biljke stvaraju eterično ulje u listovima, cvjetovima, plodovima, korijenu i drvu, a rjeđe u stabljici i kori. Nastaju iz protoplazme kao produkti disimilacije.

Eterična ulja mogu biti lokalizirana u:

- posebnim stanicama, tzv. uljenicama, koje su najjednostavniji oblik uljnih spremnika; imaju oblik „vrećica“ ispunjenih uljem, na jednom kraju drže se stanične membrane, a svojstvene su porodicama *Piperaceae, Lauraceae, Zingiberaceae* i dr.,
- intracelularnim prostorima ili kanalima koji mogu nastati shizogeno (razmicanje graničnih stanica čijim daljnjim proširivanjem nastaju kanali, npr. Apiaceae), lizogeno (otapanje staničnih membrana sekrecijskih stanica, dolazi do sekundarnog stvaranja šupljina, npr. *Rutaceae)* i shizolizogeno (kombinacija ovih procesa),
- spremnicima između kutikule i stanične membrane, tj. u žlijezdama, žljezdanim dlakama i ljuskama, a karakteristične su za porodicu *Lamiaceae* (žlijezde u obliku rozete od osam stanica), Asteraceae (stanice poredane u dva reda s najčešće osam stanica) i za mnoge druge.

Eterična ulja igraju važnu ulogu kod oplodnje biljaka jer privlače kukce koji ih oprašuju; u biokemijskoj sintezi su donori vodika; štite biljku od nepovoljnih ekstremnih uvjeta sredine; štite biljku od bolesti i štetnika. Eterična ulja imaju veliki utjecaj u borbi protiv mikroorganizama. Biološka uloga eteričnog ulja je specifična za svaku biljnu vrstu i za svaki biljni organizam, što je rezultat filogenetskog i evolucijskog razvoja svake biljne vrste. Ovo je ujedno i odgovor na pitanje zašto je eterično ulje lokalizirano u različitim organima određenih biljnih vrsta (Devetak, 1995). Sadržaj eteričnih ulja u biljnom materijalu, kao i sastav i sadržaj pojedinih sastavnica, jako se mijenja ovisno o razvojnom stadiju biljne vrste, ali i u ovisnosti o ekološkim uvjetima. Promjene su uglavnom kvantitativne, rjeđe kvalitativne. Eterična ulja su uglavnom lakša od vode pa se sakupljaju na površini, a voda ispod eteričnog ulja se također sakuplja i naziva se hidrolat ili cvjetna vodica. Hidrolat predstavlja vodenu otopinu zasićenu sastavnicama eteričnog ulja.

Eterična ulja se najčešće prizvode postupkom destilacije vodenom parom, pri čemu posebno treba voditi računa o:

- kvaliteti biljnog materijala (količina, svježina, čistoća, uzgoj)
- aparaturi (metal od kojeg su izrađeni kotlovi, oblik posude)
- trajanju destilacije, tlaku vodene pare, temperaturi

Destilaciju vodenom parom možemo vršiti kod tvari koje:

- su netopljive u vodi
- imaju do 15 ili maksimalno 20 atoma ugljika
- su dovoljno stabilne na temperaturi od 100 $^{o}$C
- kemijski ne reagiraju s vodom

U modernijim metodama dobivanja, kotao u kojem se stvara vodena para odvojen je od kotla u kojem je biljni materijal. Na taj način smanjuje se hidrolitičko djelovanje vode na pojedine spojeve npr. estere. Djelovanjem vode na estere došlo bi do razlaganja na alkohol i kiselinu. Odvajanjem kotlova postiže se bolja kvaliteta i veća stabilnost ulja. Postupak destilacije nije samo običan prijenos spojeva iz biljke u eterično ulje. Tijekom tog procesa dolazi do kemijskih reakcija, od kojih su najčešće hidroliza i oksidacija. Eterična ulja, za razliku od sintetskih proizvoda, potpuno su kompatibilna s ljudskom kožom. Kompatibilnost neke tvari označava da je ona već prisutna u organizmu ili da je organizam prihvaća zbog blagotvornih svojstava. U kemijskom smislu, eterična ulja su smjese velikog broja različitih spojeva. Do sada je utvrđeno oko 500 različitih sastojaka. Kod većine ulja jedna komponenta prevladava u tolikoj mjeri da određuje njegov opći karakter pa po njoj istraživanu vrstu svrstavamo u određeni kemotip. Spojevi koji ulaze u sastav eteričnih ulja pripadaju različitim skupinama organskih spojeva. Sastojci eteričnih ulja dijele se u dvije grupe koje se razlikuju po biogenezi, a to su terpenski spojevi i fenilpropanski derivati (Bruneton, 1995; Kalođera i Jurišić, 1998).



Slika 7. Aparatura po Clevenger-u

2.8.2. Terpenski spojevi

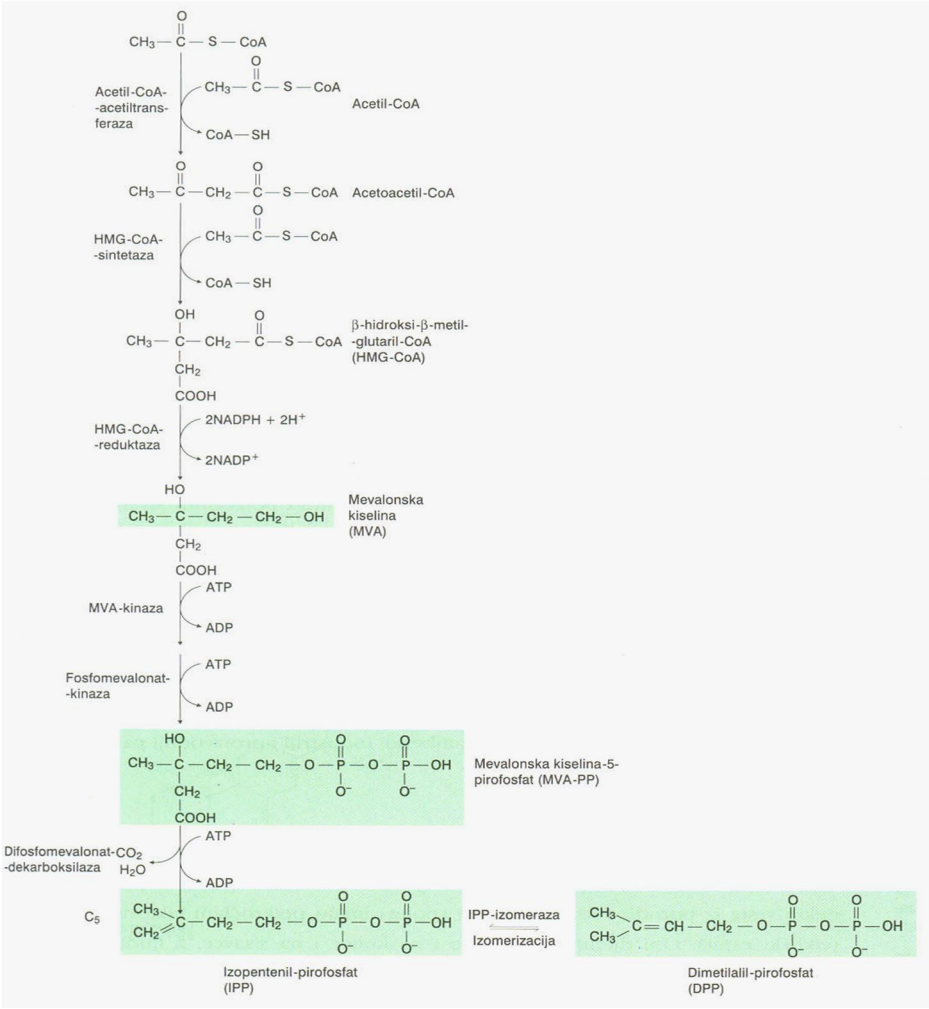
Terpeni ili terpenoidi su polimeri nastali kondezacijom izoprenskih molekula. To su metaboliti biljaka, karakterističnog okusa i mirisa i netopivi u vodi. Empirijska formula većine terpena je $(C_5H_8)_n$. Terpeni su polimeri izoprena čija biosinteza počinje od acetil – koenzima A (AcSCoA) iz kojeg uz pomoć enzima nastaje osnovna C-5 jedinica (slika 7.).
Njihova biosinteza u biljci je najčešće stereoselektivna, pa su takva eterična ulja optički aktivna, za razliku od kemijskih određivanih eteričnih ulja. Zbog cikličkih struktura, dvostrukih veza i kiralnih C–atoma, mnogi od ovih spojeva imaju, kako strukturne, tako i stereoizomere, koji se katkad razlikuju mirisom (McGarvey and Croteau, 1995).
Terpeni se mogu oksidirati i reducirati, a neki i polimeriziraju. Stoga mogu postojati i u obliku alkohol, estera, etera, oksida, aldehida i ketona (Wagner, 1993).
Prema broju ugljikovih spojeva, terpeni se dijele u skupine:

- hemiterpena ($C_5$),
- monoterpena ($C_{10}$),
- seskviterpena ($C_{15}$),
- diterpena ($C_{20}$),
- sesterterpena ($C_{25}$),
- triterpena ($C_{30}$),
- tetraterpena ($C_{40}$) i
- poliizoprena $(C_5)_n$ ($n = 45 – 10^5$).

Monoterpeni, diterpeni i tetraterpeni završne korake sinteze i smještaj vrše u plastidima, a seskviterpeni i triterpeni u citosolu (Bohlmann et al., 1998). Od navedenih terpenskih spojeva, u sastav eteričnih ulja ulaze monoterpeni i seskviterpeni. Hipoteza da se većina terpena sastoji od izoprenskih jedinica povezanih po načelu „glava na rep“, predstavljala je glavni napredak u kemiji terpena. Izoprensko pravilo, koje je formulirao Wallach 1887. godine, pokazalo je jednostavnu strukturnu povezanost tako raznolike grupe prirodnih produkata kao što su terpeni (Slika 8).

Kako su određivane skupine sve većeg broja terpena, postalo je jasno da svi terpeni ne podliježu izoprenskom pravilu u njegovom najjednostavnijem obliku. Ružička je 1953. godine postavio „biogenetsko izoprensko pravilo“, po ovom pravilu postoji jedinstveni prekursor za svaku grupu terpena iz koje se izvode različiti poznati sastojci grupe. Ružičkino pravilo ne uzima točnu biokemijsku prirodu prekursora nego samo utvrđuje da su svi izoprenske strukture (Mann et al., 1994.).

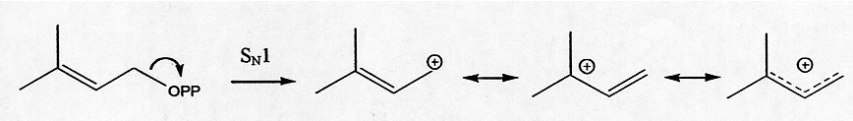
### 2.8.3. Biosinteza terpenskih spojeva




Slika 8. Sinteza dviju ishodnih izoprenskih jedinica (IPP i DPP) u putu mevalonske kiseline, izvor (Pevalek-Kozlina, 2003)

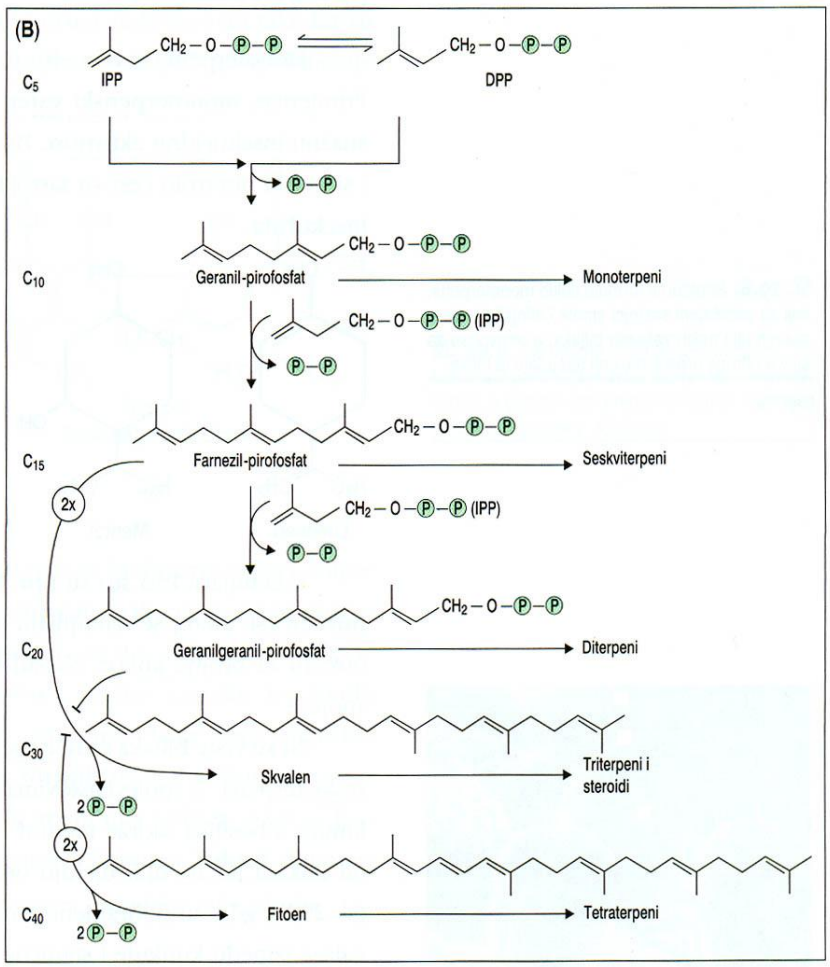
Biokemijski spojevi izoprena izvedeni su iz metabolizma acetata putem mevalonske kiseline (Lange et al., 1998). Tri molekule acetil-koenzima A koriste se za stvaranje mevalonske kiseline (MVA) koja je $C_6$ aciklički spoj, sintetiziran u citosolu (Bohlmann i sur., 1998). Aktivni spojevi izoprena identificirani su kao difosfatni (pirofosfatni) esteri: izopentenil-pirofosfat (IPP) koji izomerizira u drugu biokemijski aktivnu izoprensku jedinicu dimetilalil-pirofosfata (DPP). Ova reakcija je ireverzibilna i ravnoteža je pomaknuta na stranu DPP.

DPP posjeduje dobro odlazeću grupu difosfat, te $S_N1$-reakcijom daje alilni karbokation koji je stabiliziran rezonancijom (Slika 9).




Slika 9. DPP rezonancijom stabiliziran alil-kation, izvor (Wikipedia)

DPP je elektrofil, a IPP je nukleofil, a upravo je ova razlika u reaktivnosti ovih dviju ishodnih izoprenskih jedinica osnova za biosintezu svih terpena (Dewick, 1997) (Slika 10).




Slika 10. Biosinteza terpenskih spojeva, izvor (Pevalek-Kozlina, 2003)

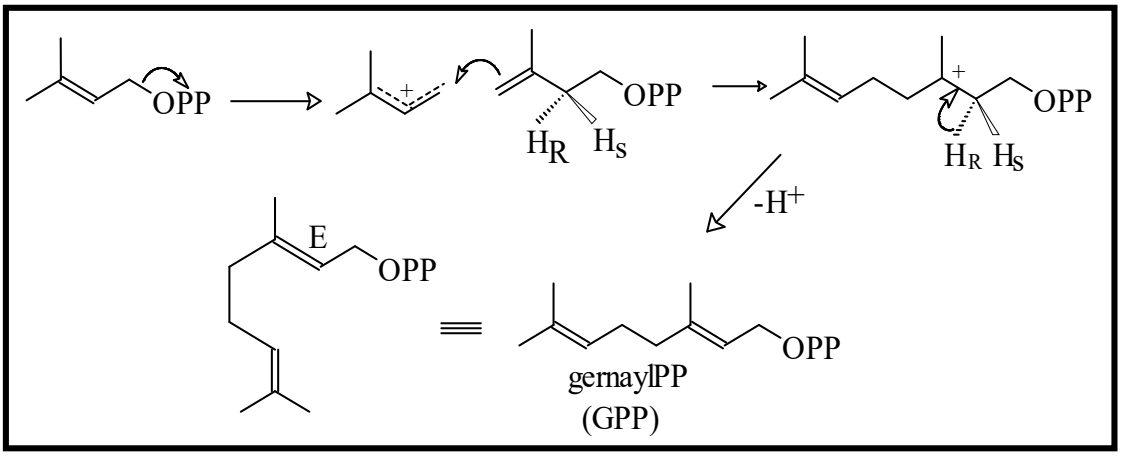
2.8.4. Monoterpeni

Monoterpeni, $C_{10}$ spojevi, sastoje se od dvije izoprenske jedinice povezane po načelu "glava na rep". U sastavu eteričnih ulja nalazi se oko 150 različitih monoterpena koji mogu biti aciklički, monociklički i biciklički spojevi.

Kombinacijom DPP, IPP i enzima transferaze nastaje geranil-pirofosfat (GPP) koji je prekursor monoterpena (Gershenzon et al., 2000).

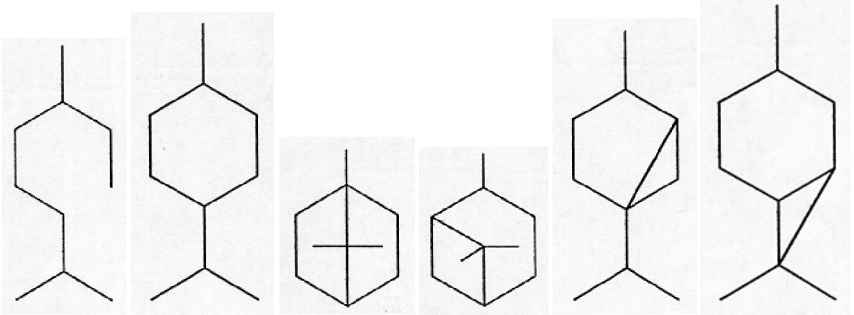
Linalil-pirofosfat (LPP) i neril-pirofosfat (NPP) su izomeri geranil-pirofosfata. Oni čine polaznu osnovu za čitav niz linearnih monoterpena (Slika 11). Količina monoterpena je povećana značajno ciklizacijskim reakcijama te mogu nastati monociklički ili biciklički spojevi.

Poznato je više od trideset tipova monoterpenskih skeleta, a uobičajeno je njih šest (Slika 12) (Mahmoud and Croteau, 2002).




Slika 11. Nastanak geranil-pirofosfata (GPP), izvor (Preuzeto iz diplomskog rada - Neli)

Mnogi od monoterpena otrovni su za kukce, npr. monoterpenski ester piretroid iz listova i cvjetova krizantema ima snažnu insekticidnu aktivnost.



Mircan p-Metan Bornan Pinan Tujan Karan

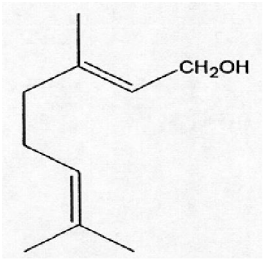
Slika 12. Tipovi monoterpenskog skeleta, izvor (Diplomski rad – Neli)

Prirodni i sintetski piretroid, budući da ne djeluju toksično na sisavce, čest su sastojak komercijalnih sredstava za uništavanja kukaca i insekticida.

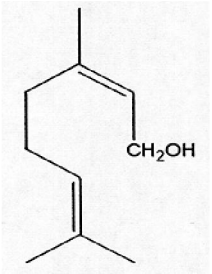
Monoterpeni se dijele u dvije skupine:

- **pravilni**, koji mogu biti: linearni, monociklički i biciklički;
- **nepravilni.**

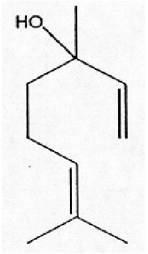
**Linearni monoterpeni** imaju skelet mircana, a najvažniji predstavnici su geraniol, nerol i linalol, njihovi oksidirani ili reducirani derivati i tri triena mircen, ocimen i aloocimen (Slika 13).



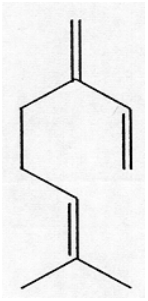

Geraniol



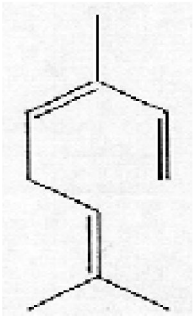

Nerol



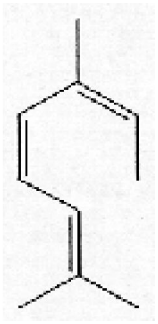

Linalol



Mircen



β-ocimen

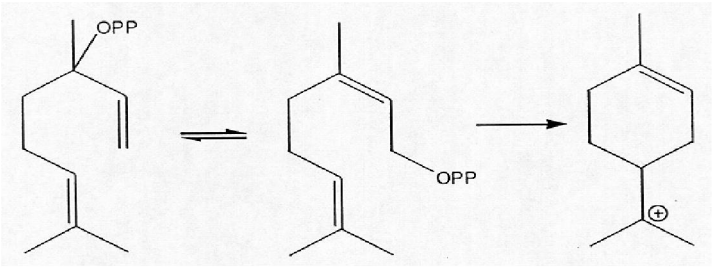


Aloocimen

Slika 13. Strukturne formule nekih linearnih monoterpena

U četinjača kao što su bor i jela, monoterpeni α- i β-pinen, limonen i mircen nakupljaju se u smolnim kanalima iglica, grana i debla. Otrovni su za brojne kukce, napad kukca često rezultira pojačanim stvaranjem ovih spojeva. U listovima mente, limuna i bosiljka se nalaze mentol i limonen koji, također, imaju ulogu zaštite od kukaca. Nalaze se u žljezdanim dlakama gdje su pohranjene u modificirane ekstracelularnim prostorima koji se nalaze između kutikule i stanične stijenke. Prekursor cikličkih monoterpena je neril-kation koji ciklizacijom daje α-terpinil-kation, odnosno terpinen-4-il-kation.

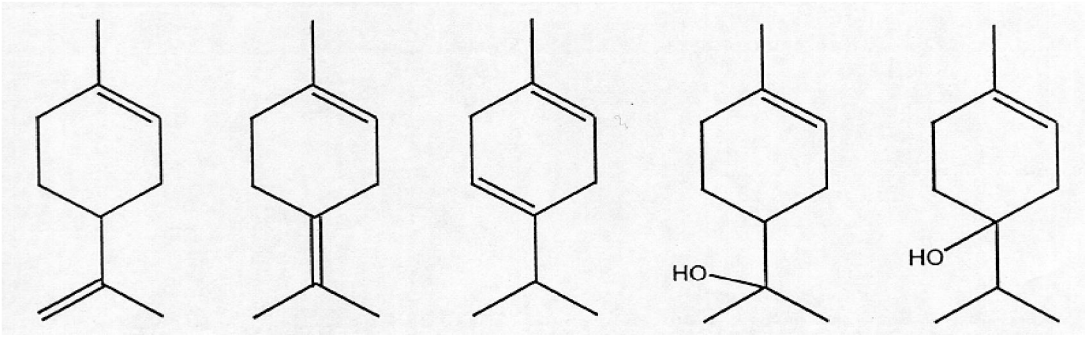
Najveću grupu monocikličkih monoterpena čine derivati p-metana (1-metil-4-izopropilcikloheksan) koji nastaju u biosintezi iz NPP i/ili LPP (Slika 14).



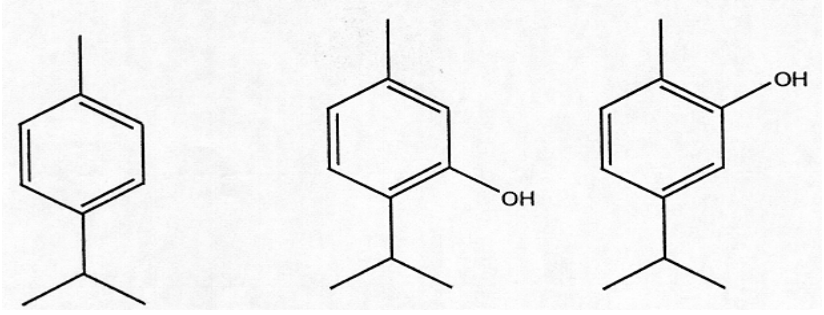

LPP NPP α-terpinil kation

Slika 14. Nastanak α-terpinil kationa iz LPP-a i /ili NPP-a, izvor (Diplomski rad – Neli)

Napadom vode na metil kation nastaje alkohol α-terpineol. Također, metil kation može otpustiti proton dajući pri tome limonen. Tu su još značajni spojevi terpinolen, α i γ-terpinen, terpinen-4-ol, aromatski spojevi p-cimena i njegovi fenolni derivati, timol i karvakrol.



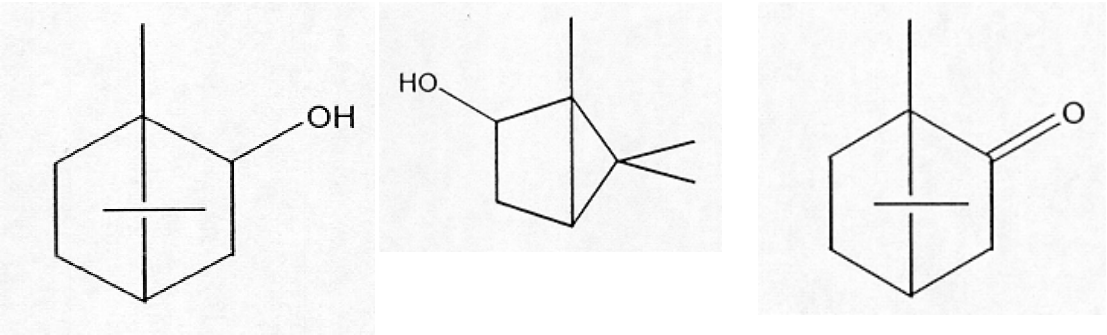

Limonen Terpinolen γ-Terpinen α-Terpinolen Terpinen-4-ol



p-Cimen Timol Karvakrol

Slika 15. Strukturne formule monocikličkih monoterpena, izvor (Diplomski rad – Neli)

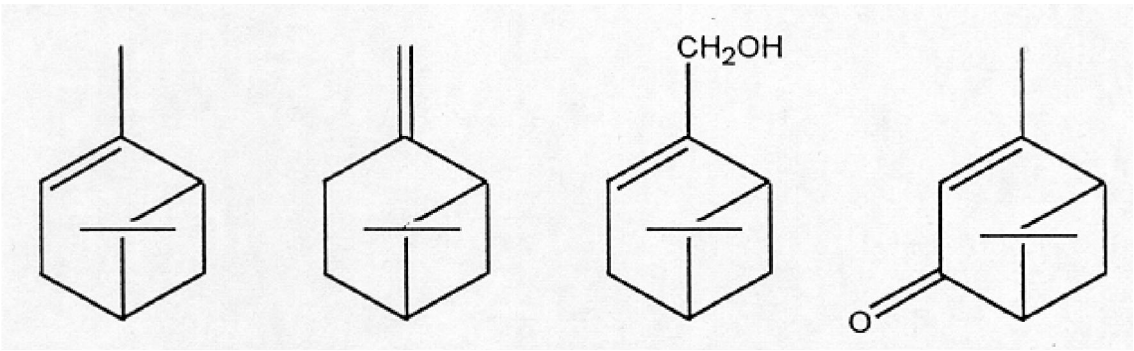
Najvažniji biciklički monoterpeni sa skeletom bornala su borneol, izoborneol i kamfor (Slika 15). Borneol nastaje gašenjem bornil kationa vodom i zatim oksidacijom sekundarnog alkohola daje keton kamfor (Slika 16).




Borneol Izoborneol Kamfor

Slika 16. Strukturne formule nekih bicikličkih monoterpena, izvor (Diplomski rad – Neli)

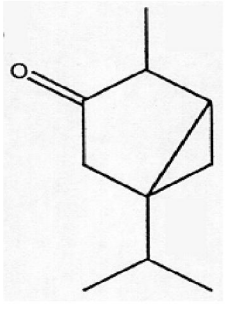
Otpuštanjem protona s pinil kationa nastaju α-pinen i β-pinen. Uz ove bicikličke spojeve pinanskog skeleta javljaju se i njihovi derivati mirtenol i verbenon (Slika 17).




α-Pinen β-Pinen Mirtenol Verbenon

Slika 17. Spojevi pinanskog skeleta, izvor (Diplomski rad – Eli)

Tujonsku skupinu bicikličkih monoterpena čine ketoni tujon (Slika 18.) i izotujon, odgovarajući alkoholi te ugljikovodik α-tujen, sabinen, sabinol i sabinen-hidrat.

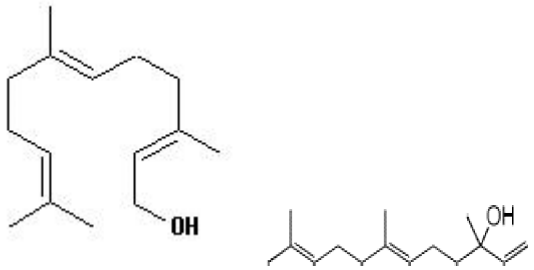


Slika 18. Strukturna formula tujona

Manje uobičajen završni korak koji uključuje stvaranje ciklopropanskog prstena je 3-karen, to je biciklički monoterpen s karanskim skeletom. Posebnu grupu monoterpena čine spojevi sa skeletom iridana (1,2-dimetil-3-izopropilciklopentan) koji nastaju od GPP-a. Nepravilni monoterpeni su oni kod kojih su izoprenske jedinice povezane glava - glava, glava – sredina ili spojevi nastali pregradnjom glava – rep struktura. Drugoj skupini ovih monoterpena prekursor je krizantemil–pirofosfat koji nastaje kondenzacijom dviju molekula DPP (Dewick, 1997; Bruneton, 1995; Mann et al., 1994; Schreier, 1984).

### 2.8.5. Seskviterpeni

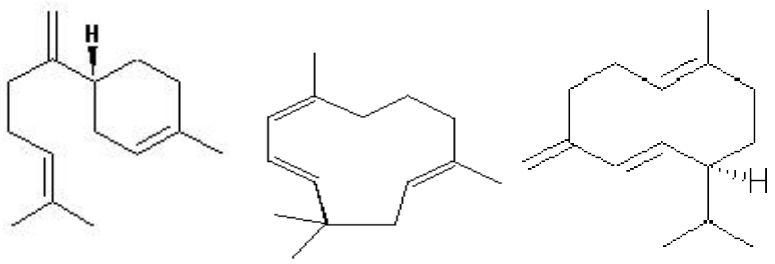
Seskviterpeni su linearni i ciklički $C_{15}$ spojevi čiji je prekursor farnezil–pirofosfat (FPP) koji nastaje adicijom izopentil–pirofosfata na geranil-pirofosfat. Oko 1000 seskviterpenskih spojeva čini najveću skupinu unutar terpena. Razlikuju se aciklički, monociklički, biciklički i triciklički seskviterpeni. Poznato je više od dvije stotine različitih tipova seskviterpenskih skeleta, nastalih kao posljedica ciklizacija, pregradnja i oksidacija (Mann et al., 1994).
Kao antiherbivorni agensi poznati su seskviterpenski laktoni, npr. kostunolid, nađen u žljezdastim dlakama nekih vrsta iz porodice Asteraceae. Imaju peteročlani laktonski prsten (ciklički ester) i djeluju odbijajuće i na kukce i ljude. U ovu skupinu terpena ubraja se i aromatski dimer seskviterpena, gosipol, iz subepidermskih žlijezda pamuka, odgovoran za značajnu otpornost nekih varijanata pamuka prema kukcima.
Spojevi farnezol i nerolidol su najpoznatiji primjer acikličkih seskviterpena (Slika 19).




Farnezol Nerolidol

Slika 19. Formule nekih acikličkih seskviterpena, izvor (Diplomski rad – Neli)

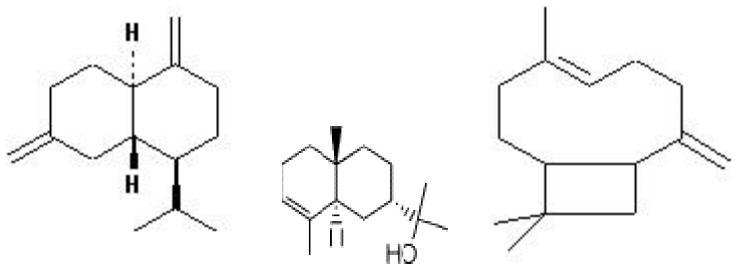
Spojevi bisabolen, humulen i germakren D su primjeri monocikličkih seskviterpena (Slika 20).



Bisabolen Humulen Germakren D

Slika 20. Strukturne formule nekih monocikličkih seskviterpena, izvor (Pevalek – Kozlina, 2008.)

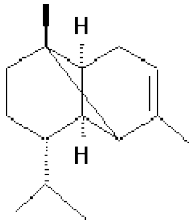
Kadinen, eudesmol i β-kariofilen su primjeri najzastupljenijih bicikličkih seskviterpena (Slika 21).



Kadinen Eudesmol *β*-Kariofil

Slika 21. Strukturne formule najzastupljenijih bicikličkih seskviterpena, izvor (Diplomski rad – Neli)

Azuleni su spojevi koji nekim uljima daju intenzivno plavu boju, a spadaju u skupinu bicikličkih seskviterpena. Kopaen je najpoznatiji triciklički seskviterpen (Slika 22).



Slika 22. Strukturna formula kopaena, izvor (Diplomski rad – Neli)

## 2.9. Eterična ulja roda *Micromeria*

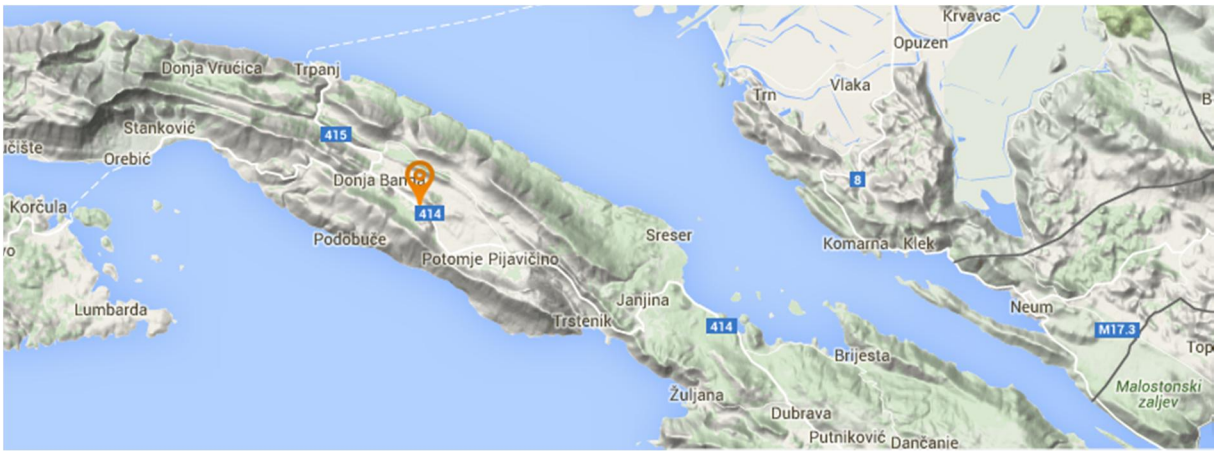
Pregledom literaturnih podataka o sastavu eteričnog ulja različitih vrsta biljaka iz roda *Micromeria* vidljiv je vrlo raznolik kemotipski sastav ulja. U sastavu ulja vrste *M. thymifolia* najvećim dijelom prevladava piperitenon (6.3%) i piperitonen oksid (9.8%), a udio seskviterpena kod svih istraživanih vrsta *M. thymifolia* varira između 2.9% i 4.3%.
Kod vrste *M. dalmatica* dominantni su također oksigenirani terpeni (74.1%) s udjelom piperitenona (56.7%) i pulegona (12.1%), dok seskviterpena je samo 5.9%.
Vrsta *M. pulegion* sadrži izomenton (27.2%), a seskviterpena je svega 13.3%. Oksigenirani terpeni čine udio od 51.8% (Duru et al., 2004).
Ulje vrsta *M. albanica* sastoji se od oksigeniranih terpena (81.1%), u kojima prevladavaju piperiton oksid (36.9%), piperitenon oksid (21.9%) i piperitenon (10%), dok seskviterpeni čine 5.3% (Duru et al., 2004).

Za *M. croatica* je utvrđeno da najvećim dijelom sadrži kariofilen oksid (24.4%) i y-kadinene (10.9%). Biciklički monoterpen, borneol, također je dominatan sa udjelom od 10.8%. Oksigenirani terpeni čine udio od 1.7% (Duru et al., 2004). O sastavu ulja vrste *M. croatica* su objavljena samo dva znanstvena rada. Prema Staniću i suradnicima glavni sastojci ulja iz biljke *M. croatica* s Velebita bili su borneol (22.4%), t- kadinol (9.08%), ibid (8.69%) i elemene (8.04%). Velike skupine bile su seskviterpeni (46.34%) i ketones (19.68%). U radu Slavovske i suradnika, kariofilen oksid (24.4%) je glavni sastojak u ulju biljke *M. croatica* iz zapadne Srbije. U uzorku biljke *M. croatica* iz Srbije, velike grupe bile su oksigenirani seskviterpeni, seskiterpen hidrokarboni, oksigenirani monoterpeni i monoterpenski hidrokarboni koji sačinjavaju 44.2, 22.7, 21.0 i 7.0%. Kariofilen oksid je također bio glavni sastojak u ulju biljke *M. juliana* iz Hrvatske, dok su verbenol (11.8%) i isoborneol (11.3%) bili glavni sastojci u *M. juliana* i *M. cristata* (Hampe) Griseb. iz Crne Gore i južne Srbije. β-kariofilen i kariofilen oksid (9.9-17.9%) bili su dominantni sastojci u eteričnim uljima *M. cremnophila* Boiss. et Heldr. i *M. graeca* (L.) Benth. et Rchb., a po sastavu i sadržaju seskviterpena su najsličniji našoj endemskoj vrsti *M. croatica* (Kremer et al., 2012). U ulju *M. kerneri* utvrđeno je najveći udio kariofilen oksida (39.2%), *β*-pinen (6.3%), dokosan (5.4%) te kamfora (4.3%) (Duru et al., 2004). Pulegone, izomenton, p-menton, limonen, linalol, α-

pinen, β-pinen, p-cimen, α-terpinen, γ-terpinen, α-terpineol, kamfen, β-bourbonen i borneol su najzastupljeniji sastojci eteričnog ulja kod vrsta roda *Micromeria* (Duru et al., 2004.). Kvantitativne i kvalitativne razlike u sastavu ulja vrsta *Micromeria* ovise o zemljopisnim i klimatskim faktorima pa ih svrstavamo u posebne kemotipove. Znanstvena istraživanja koja su obavljena na biljkama roda *Micromeria* otkrivaju sastav eteričnih ulja koja sadrže sljedeće organske spojeve terpene, aldehide, alkohole, etere, okside, ketone i estere (Slavkovska et al., 2005). Puno znanstvenih radova je posvećeno utjecaju eteričnog ulja na pojedine bakterijske kulture, a naročito utjecaj na gljivicu *Candida albicans* (Slavkovska et al., 2005). Vrste roda *Micromeria* najčešće se koriste u kulinarstvu kao začini ili napitci, ali i jako često u narodnoj medicini (Baytop, 1984; Ali-Shtayeh et al., 1998).

### 2.9.1. Klimatski uvjeti Pijavičino, poluotok Pelješac

Pelješac je poluotok na jugu Dalmacije dug 65 km i s površinom od gotovo 350 $km^2$ (Slika 23). Krasi ga neobična geografska raznolikost koja opet oblikuje iznimne mikroklimatske uvjete. Prosječne temperature se kreću od svega 7$^o$ C u siječnju, pa sve do 26$^o$ C u srpnju. Također ga karakteriziraju i velike visinske razlike kao i brojne padine uz more, a najviši vrh je 961 m (sv.Ilija kraj Orebića). Kroz svoju burnu povijest nije ga zaobišla ni jedna važnija civilizacija koja je ostavila traga u ovom dijelu mediterana. Tako su svoj trag ostavili Iliri, Grci, Rimljani, Mlečani, Francuzi, Austrougarska monarhija, a tu je i autohtona kultura koja se razvijala pod njihovim utjecajima. Pod utjecajima ovih kultura Pelješac se oblikovao i formirao kao vrlo važan gospodarski subjekt prvenstveno zbog svojih resursa koji su povijesno gledano imali veliku važnost u ranoj trgovinskoj razmjeni. Trgovalo se sa solju, vinom, ribom, uljem i morskim plodovima. Zahvaljujući posebnom okusu vina koje je dolazilo s Pelješca, ovaj komadić zemlje postao je od davno poznat kao posebno plodan vinogradarski kraj. (https://hr.wikipedia.org/wiki/Pijavi%C4%8Dino)



Slika 23. Smještaj poluotoka Pelješca i mjesta Pijavičino, izvor (Google maps).

# 3. Materijal i metode

## 3.1. Sakupljanje materijala

Vrste *Micromeria juliana* i *Micromeria kerneri* sakupljene su u Pijavičinom na poluotoku Pelješcu.

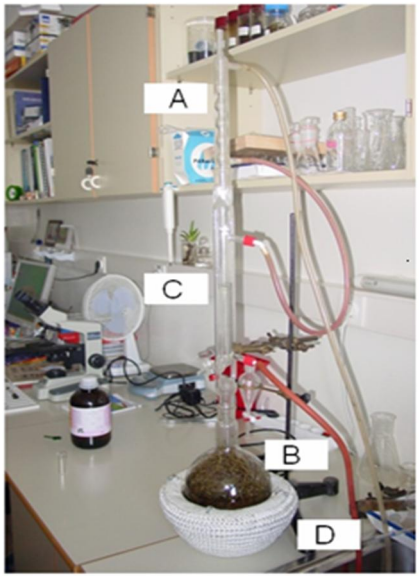
## 3.2. Izolacija eteričnih ulja vrsta *Micromeria juliana* (L.) i *Micromeria kerneri* (Murb.)

Iz biljnog materijala smo izolirali eterično ulje vodenom destilacijom (tri sata) u aparaturi po Clevenger- u.

Aparatura se sastoji od:

- tikvice od 1000 mL,
- graduirane cijevi,
- hladila i
- kalote.

Koristilo se oko 100g suhog materijala u 500 ml vode. U tikvicu je dodano i 2 ml pentana ($C_5H_{12}$, M = 72,15g/mol) u unutarnji dio graduirane cijevi zbog mogućnosti gubitaka otopljenih, hlapljivih spojeva. Nakon završetka destilacije, otopina ulja u pentanu je odijeljena od vode. Ulje je odvagano i izračunat je maseni udio ulja u biljnom materijalu. Uzorak se čuva u hermetički zatvorenoj bočici u hladnjaku do analize.




Slika 24. Aparatura po Clevenger-u; A – hladilo, B – tikvica, C – graduirana cijev, D - kalota

3.3.GC/MS i GC/FID analiza eteričnog ulja

GC/FID analiza rađena je na plinskom kromatografu Varian 3900 s plameno ionizacijskim detektorom FID i kapilarnom kolonom VF-5ms (30mm x 0.25mm debljina sloja adsorbensa 0.25µm) sa stacionarnom fazom 5%-fenil-95%-dimetilpoliksilanom. Plin nositelj je vodik protoka 1.2 mL $min^{-1}$, injekcioni volumen je 1 µL, omjer cijepanja 1:10, temperatura injekcionog bloka je 250 ° C.

GC/MS analiza rađena je na sistemu Varian Saturn 2100 na kapilarnoj koloni VF-5ms s istim temperaturnim programom kao i GC. Plin nositelj je helij s linearnim vektorom 31.5 cm/s, omjerom cijepanja 1:60, ionizacijskom energijom 70 eV, temperaturom 280 ° C i jedinicama mase 40 – 600 m/z. Identifikacija je provedena usporedbom masenih spektara nepoznatih tvari s masenim spektrima iz komercijalne biblioteke masenih spektara (NIST/02 MS library) (Adams, 2007).

Za svaki analizirani uzorak dobili smo:

- kromatogram ukupne ionske struje,
- vrijeme zadržavanja svake komponente, koja je predstavljena pikom,
- udio pojedine komponente izražen u postocima, tj. udio površine pika u ukupnoj površini,

naziv spoja/spojeva čiji spektar je najsličniji spektru nepoznate komponente, sličnosti spektara koji su uspoređivani izraženi su u postotcima.

# 4. Rezultati istraživanja

## 4.1. Sastav eteričnog ulja vrste *Micromeria kerneri* (Murb.)

Izolacija eteričnog ulja iz lista osušene biljke, vrste *Micromeria kerneri* Murb., provedena je vodenom destilacijom u aparaturi po Clevenger-u (Slika 24). Dobiveni uzorak ulja je analiziran sustavom plinske kromatografije – masene spektrometrije (GC/MS analiza) i plameno – ionizacijskom kromatografijom (FID). GC/MS analizom korištenom u ovom radu kod vrste *Micromeria kerneri* Murb., identificirana su 42 spoja koji predstavljaju 90.0% cjelokupnog ulja s postotkom ulja u 100g suhog biljnog materijala (Slika 25). Ulje vrste *Micromeria kerneri* (Murb.) sastoji se od monoterpenskih hidrokarbonata (1.5%), oksigeniranih monoterpena (32.4%), seskviterpenskih hidrokarbonata (17.0%), oksigeniranih seskviterpena (34.4%), fenolnih spojeva (2.2%), karbonilnih spojeva (0.8%) i hidrokarbonata (1.7%) (Tablica 1 i Slika 26).



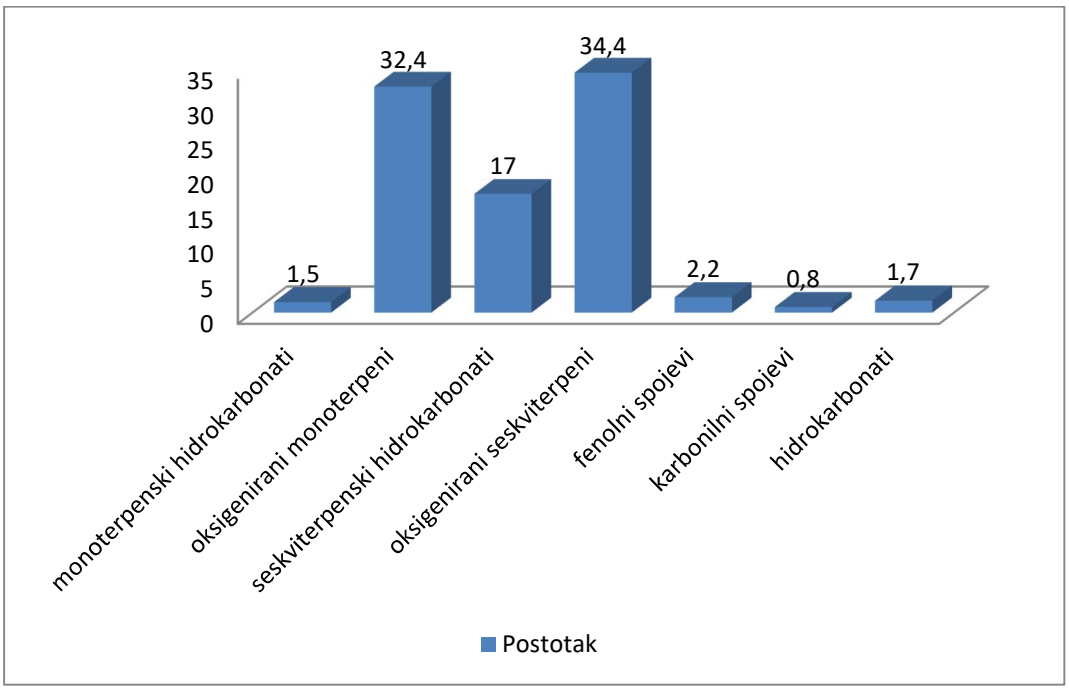

Slika 25. Kromatogram sastava eteričnog ulja biljke *Micromeria kerneri*

Tablica 1. Fitokemijski sastav (%) eteričnog ulja vrste *Micromeria kerneri* (Murb.)

| Komponente | RI | % | Identifikacija |
|---|---|---|---|
| ***Monoterpenski hidrokarbonati*** | | **1.5** | |
| Limonen | 1032 | 0.1 | RI, MS |
| (*Z*)-*β*-Ocimen | 1052 | 0.5 | RI, MS, S |
| *γ*-Terpinen | 1057 | 0.5 | RI, MS |
| cis-Sabinen hidrat | 1065 | 0.3 | RI, MS |
| *allo*-Ocimen | 1128 | 0.1 | RI, MS |
| | | | |
| ***Oksigenirani monoterpeni*** | | **32.4** | |
| *trans* -Linalol oksid (furanoid) | 1088 | 2.7 | RI, MS, S |
| Linalool | 1099 | 3.0 | RI, MS, S |
| *β*-Thujon | 1121 | 1.5 | RI, MS |
| *trans*-Pinocarveol | 1147 | 2.5 | RI, MS |
| Kamfor | 1151 | 4.0 | RI, MS |
| Borneol | 1176 | 0.9 | RI, MS, S |
| Terpinen-4-ol | 1184 | 6.0 | RI, MS |
| Mirtenol | 1197 | 1.9 | RI, MS |
| Verbenon | 1204 | 7.0 | RI, MS |
| *trans*-Karveol | 1215 | 0.5 | RI, MS |
| Piperiton | 1250 | 0.9 | RI, MS |
| Linalilacetat | 1252 | 0.2 | RI, MS |
| Bornilacetat | 1285 | 0.2 | RI, MS |
| *α*-Terpenilacetat | 1349 | 1.1 | RI, MS |
| | | | |
| ***Seskviterpenski hidrokarbonati*** | | **17.0** | |
| *α*-Kopaen | 1377 | 0.1 | RI, MS |
| *β*-Bourbonen | 1383 | 0.3 | RI, MS |
| *α*-Gurjunen | 1407 | 0.9 | RI, MS |
| *E*-Kariofilen | 1424 | 5.6 | RI, MS, S |
| *β*–Kopaen | 1429 | 1.2 | RI, MS |
| *allo*-Aromadendren | 1465 | 2.3 | RI, MS |
| Germakren D | 1481 | 6.6 | RI, MS |
| Biciklogermakren | 1500 | 0.4 | RI, MS |
| *β*-Bisabolen | 1494 | 0.5 | RI, MS |
| *δ*-Kadinen | 1517 | 1.0 | RI, MS |
| | | | |
| ***Oksigenirani seskviterpeni*** | | **34.4** | |
| Spatulenol | 1577 | 1.4 | RI, MS |
| Kariofilenoksid | 1581 | 23.1 | RI, MS, S |
| *γ*-Eudesmol | 1632 | 0.3 | RI, MS |

| | | | |
|---|---|---|---|
| α-Kadinol | 1655 | 0.4 | RI, MS |
| α-Bisabolol | 1688 | 3.8 | RI, MS |
| α-Bisabolol oksid | 1748 | 5.4 | RI, MS |
| | | | |
| ***Fenolni spojevi*** | | **2.2** | |
| Timol | 1290 | 0.9 | RI, MS, S |
| Karvakrol | 1298 | 1.1 | RI, MS, S |
| Eugenol | 1370 | 0.2 | RI, M, S |
| | | | |
| ***Karbonilni spojevi*** | | **0.8** | |
| 1-Okten-3-ol | 974 | 0.7 | RI, MS |
| 3-Oktanol acetat | 1125 | 0.1 | RI, MS |
| | | | |
| ***Hidrokarbonati*** | | **1.7** | |
| Heneikosan | 2100 | 0.9 | RI, MS, S |
| Dokosan | 2200 | 0.5 | RI, MS, S |
| Oktakosan | 2800 | 0.3 | RI, MS, S |
| ***Ukupno identificirano (%)*** | | **90.0** | |

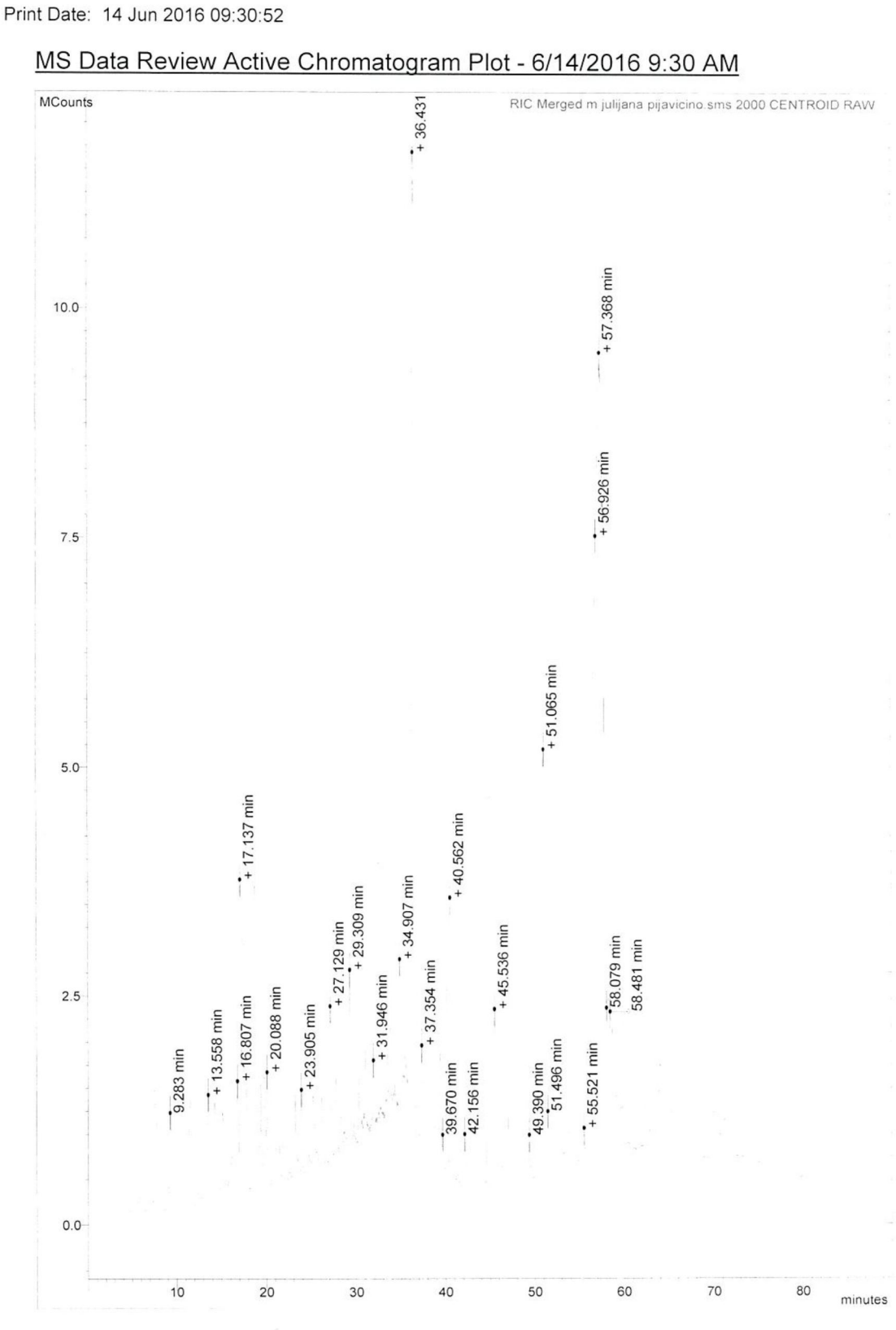
RI = Indeksi zadržavanja spojeva određeni u odnosu na niz n-alkana ($C_8$-$C_{40}$) na nepolarnoj kapilarnoj koloni VF-5MS, RI identifikacija prema literaturi (Adams, 2007) i/ili prema našoj bazi podataka; MS = identificirani spojevi prema NIST02 i Wiley 7 bazi podataka; S = identifikacija pomoću referentnih spojeva.



Slika 26. Postotni udjeli zastupljenih skupina spojeva izraženih u 100%-om omjeru kod vrste *Micromeria kerneri*

## 4.2. Sastav eteričnog ulja vrste *Micromeria juliana* (L.)

Izolacija eteričnog ulja iz lista osušene biljke, vrste *Micromeria juliana* L., provedena je vodenom destilacijom u aparaturi po Clevenger-u (Slika 25). Dobiveni uzorak ulja je analiziran sustavom plinske kromatografije – masene spektrometrije (GC/MS analiza) i plameno – ionizacijskom kromatografijom (FID). GC/MS analizom korištenom u ovom radu kod vrste *Micromeria juliana*L., identificirano je 120 spojeva koji predstavljaju 95.2% cjelokupnog ulja s postotkom ulja u 100g suhog biljnog materijala (Slika 27). Ulje vrste *Micromeria juliana* (L.) sastoji se od monoterpenskih hidrokarbonata (10.3%), oksigeniranih monoterpena (26.4%), seskviterpenskih hidrokarbonata (31.3%), oksigeniranih seskviterpena (23.0%), fenolnih spojeva (2.4%), karbonilnih spojeva (0.6%) i hidrokarbonata (1.2%) (Tablica 2 i Slika 28).



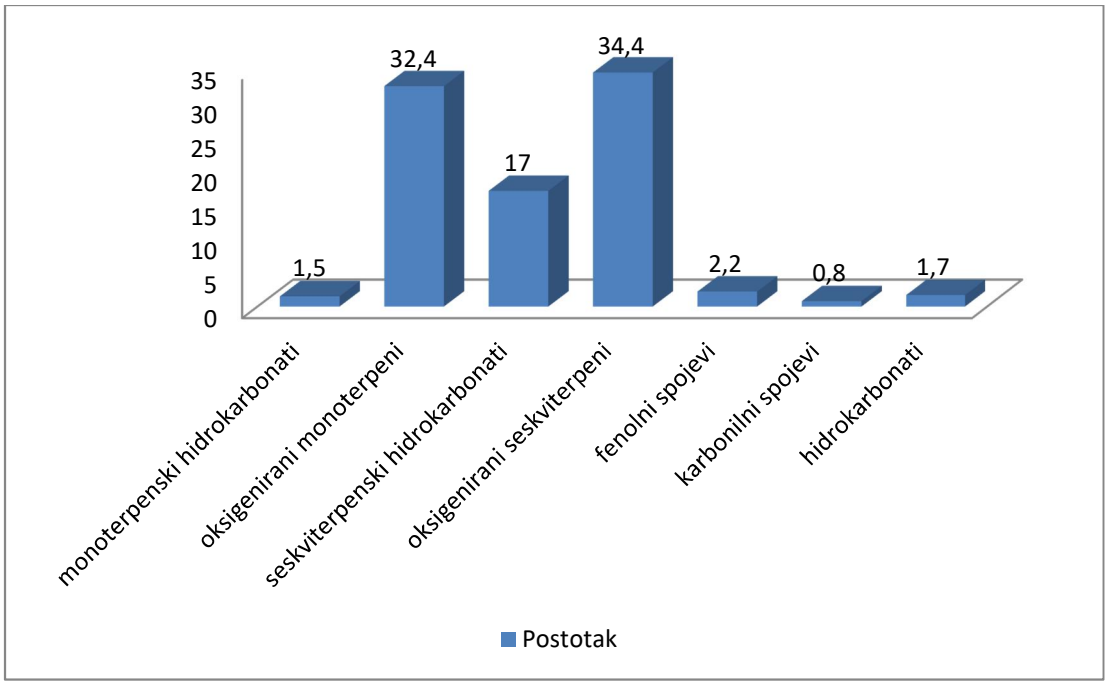

Slika 27. Kromatogram sastava eteričnog ulja biljke *Micromeria juliana.*

Tablica 2. Fitokemijski sastav (%) eteričnog ulja vrste *Micromeria juliana* (L.)

| Komponente | RI | % | Identifikacija |
|---|---|---|---|
| ***Monoterpenski hidrokarbonati*** | | **10.3** | |
| *α*-Pinen | 938 | 0.5 | RI, MS, S |
| Verbenen | 960 | 1.2 | RI, MS |
| Kamfen | 962 | 0.5 | RI, MS, S |
| Sabinen | 971 | 0.6 | RI, MS |
| *β*-Pinen | 982 | 3.2 | RI, MS |
| *α*-Terpinen | 1016 | 1.2 | RI, MS |
| *p*-Cimen | 1021 | 1.5 | RI, MS |
| β-Felandren | 1025 | 1.3 | RI, MS |
| Limonen | 1032 | 0.3 | RI, MS |
| | | | |
| ***Oksigenirani monoterpeni*** | | **26.4** | |
| *trans* -Linalol oksid (furanoid) | 1088 | 0.7 | RI, MS, S |
| Linalool | 1099 | 8.3 | RI, MS, S |
| *β*-Thujon | 1121 | 0.2 | RI, MS |
| *trans*-Pinocarveol | 1147 | 1.2 | RI, MS |
| Kamfor | 1151 | 0.2 | RI, MS |
| Pinocarvon | 1160 | 3.2 | RI, MS |
| Borneol | 1176 | 1.7 | RI, MS, S |
| Verbenon | 1204 | 0.3 | RI, MS |
| *trans*-Karveol | 1215 | 0.3 | RI, MS |
| Piperiton | 1250 | 2.8 | RI, MS |
| *α*-Terpenilacetat | 1349 | 0.3 | RI, MS |
| Nerilacetat | 1358 | 0.3 | RI, MS |
| Piperitonoksid | 1366 | 6.9 | RI, MS |
| | | | |
| ***Seskviterpenski hidrokarbonati*** | | **31.3** | |
| *α*-Kopaen | 1377 | 0.7 | RI, MS |
| *β*-Bourbonen | 1383 | 4.1 | RI, MS |
| *E*-Kariofilen | 1424 | 16.2 | RI, MS, S |
| *β*–Kopaen | 1429 | 0.5 | RI, MS |
| *trans*-*α*-Bergamoten | 1433 | 0.2 | RI, MS |
| *α*-Humulen | 1456 | 1.9 | RI, MS |
| *β*-Chamigren | 1477 | 0.3 | RI, MS |
| Germakren D | 1481 | 4.6 | RI, MS |
| Biciklogermakren | 1500 | 0.3 | RI, MS |
| *β*-Bisabolen | 1494 | 1.4 | RI, MS |
| *δ*-Kadinen | 1517 | 0.9 | RI, MS |
| | | | |
| ***Oksigenirani seskviterpeni*** | | **23.0** | |
| Spatulenol | 1577 | 0.2 | RI, MS |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Kariofilenoksid | 1581 | 15.3 | RI, MS, S |
| $\gamma$-Eudesmol | 1632 | 0.6 | RI, MS |
| $\alpha$-Bisabolol | 1688 | 2.1 | RI, MS |
| $\alpha$-Bisabolol oksid | 1748 | 4.8 | RI, MS |
| | | | |
| ***Fenolni spojevi*** | | **2.4** | |
| Timol | 1290 | 1.2 | RI, MS, S |
| Karvakrol | 1298 | 0.7 | RI, MS, S |
| Eugenol | 1370 | 0.5 | RI, M, S |
| | | | |
| ***Karbonilni spojevi*** | | **0.6** | |
| 1-Okten-3-ol | 974 | 0.2 | RI, MS |
| 3-Oktanol acetat | 1125 | 0.4 | RI, MS |
| ***Hidrokarbonati*** | | **1.2** | |
| Eikosan | 2000 | 0.2 | RI, MS, S |
| Heneikosan | 2100 | 0.1 | RI, MS, S |
| Dokosan | 2200 | 0.3 | RI, MS, S |
| Trikosan | 2300 | 0.2 | RI, MS, S |
| Tetrakosan | 2400 | 0.4 | RI, MS, S |
| ***Ukupno identificirano (%)*** | | **95.2** | |

RI = Indeksi zadržavanja spojeva određeni u odnosu na niz n-alkana ($C_8$-$C_{40}$) na nepolarnoj kapilarnoj koloni VF-5MS, RI identifikacija prema literaturi (Adams, 2007) i/ili prema našoj bazi podataka; MS = identificirani spojevi prema NIST02 i Wiley 7 bazi podataka; S = identifikacija pomoću referentnih spojeva.




Slika 28. Postotni udjeli zastupljenih skupina spojeva izraženih u 100%-om omjeru kod vrste *Micromeria juliana*

## 5. Rasprava

Vrsta *Micromeria juliana* (L.) je niski zeleni polugrm visine 10 do 40 cm, sa brojnim, uspravnim i dlakavim stabljikama. Listovi su dužine 3-8 cm, a širine 1-2.5 mm. Donji listovi su ovalni, srednji lancelasti, a gornji usko lancelasti, paralelnih rubova. Mali crveni cvjetovi smješteni u zbijenim račvicama čine isprekidan grozd. Čaška je usko zvonastva, sivo zelena, 2,5-3,5 mm duga, izvana dlakava, a zupci su upola dugi kao cijev čaške. Vjenčić je ljubičaste boje, samo izvana dlakav i oko 5 mm dug (Pavlinović, 2015).

*Micromeria kerneri* Murb. je jednogodišnja, zeljasta, vrlo razgranata i mirisna, oko 30 – 40 cm visoka biljka. Stabljika je četverobridna sa malim žljebovima. Listovi su sitni, sjedeći, cjeloviti i dlakavi. Dlake strše  na stabljici. Cvatovi su jednako dugi ili dulji od lista. Cvjetovi su hermafroditi, od 6 do 10 poredani u prividni pršljen, u sjedećim, pazušnim parovima. Čaška je u ždrijelu rijetko dlakava. Korola je ljubičasta i duga 3-4 mm (Pavlinović, 2015).

Obje vrste su prikupljene u srpnju 2012. godine na Pelješcu. One spadaju u porodicu *Lamiaceae* koja je karakteristična po prisutnosti eteričnog ulja. Znanstvena istraživanja koja su obavljena na biljkama roda *Micromeria* otkrivaju sastav eteričnih ulja koja sadrže sljedeće organske spojeve: terpene, aldehide, alkohole, etere, okside, ketone i estere. Najzastupljeniji sastojci eteričnog ulja kod vrsta roda *Micromeria* su izomenton, p-menton, limonen, linalol, kamfor, terpinen, kamfen, kariofilen oksid, E-kariofilen i borneol (Pavlinović, 2015).

Analizom eteričnog ulja biljaka *Micromeria kerneri* i *Micromeria juliana* s lokaliteta Pijavičino na poluotoku Pelješcu utvrđeno je da te dvije biljne vrste imaju sličan kvalitativni kemijski sastav eteričnog ulja, ali različit kvantitativni sastav ulja. Biljni materijal je prikupljen u srpnju 2012. godine na Pelješcu. Kod biljke *Micromeria kerneri* sastav ulja je bio sljedeći:

- 1,5% monoterpenskih hidrokarbonata
- 32,4% oksigeniranih monoterpena
- 17% seskviterpenskih hidrokarbonata
- 34,4% oksigeniranih seskviterpena
- 2,2% fenolnih spojeva
- 0,8% karbonilni spojeva
- 1,7% hidrokarbonata

Analizom eteričnog ulja je utvrđeno prisustvo 42 kemijska spoja koji predstavljaju 90% ukupno identificiranih spojeva. Najzastupljeniji monoterpenski hidrokarbonata je terpinen (0,5%), oksigenirani monoterpen je verbenon (7%), seskviterpenski hidrokarbonat je germakren D, oksigenirani seskviterpen je kariofilen oksid koji je ujedno i najzastupljeniji spoj u sastavu eteričnog ulja kernerove bresine i predstavlja najviši pik na kromatogramu, najzastupljeniji fenolni spoj je karvakrol (1,1%), karbonilni spoj je 1-okten-3-ol i hidrokarbonat je heneikosan (0,9%).

Kod biljke *Micromeria juliana* sastav ulja je bio sljedeći:

- 10,3% monoterpenskih hidrokarbonata
- 26,4% oksigeniranih monoterpena
- 31,3% seskviterpenskih hidrokarbonata
- 23% oksigeniranih seskviterpena
- 2,4% fenolnih spojeva

- 0,6% karbonilnih spojeva
- 1,2% hidrokarbonata

Analizom eteričnog ulja je utvrđeno prisustvo 120 kemijskih spojeva koji predstavljaju 95,2% ukupno identificiranih spojeva. Najzastupljeniji monoterpenski hidrokarbonat je bio *β*-Pinen (3,2%), oksigenirani monoterpen je linalool (8,3%), seskviterpenski hidrokarbonat je *E*-kariofilen (16,2%) koji je i ujedno najzastupljeniji spoj u sastavu eteričnog ulja julijske bresine te predstavlja najviši pik na kromatogramu, najzastupljeniji oksigenirani seskviterpen je kariofilen oksid (15,3%), fenolni spoj je timol (1,2%), karbonilni spoj je 3-oktanolacetat (0,4%) i hidrokarbonat je tetrakosan (0,4%). Usporedbom sastava eteričnih ulja vidimo da su najviše razlike u:

- Monoterpenskih hidrokarbonatima. Vrsta *Micromeria juliana* je bogatija spojevima koji spadaju u skupinu monoterpenskih hidrokarbonata.
- Seskviterpenskim hidrokarbonatima. Vrsta *Micromeria juliana* je skoro dvostruka bogatija spojevima koji spadaju u skupinu seskviterpenskih hidrokarbonata.
- Oksigeniranim seskviterpenima. Vrsta *Micromeria kerneri* je bogatija spojevima koji spadaju u skupinu oksigeniranih seskviterpena.
- Najzastupljeniji spoj. Najzastupljeniji spoj kod biljke *Micromeria kerneri* je kariofilen oksid dok je kod biljke *Micromeria juliana* najzastupljeniji spoj *E*-kariofilen.

Kod vrste *Micromeria croatica* Schott najvećim su dijelom zastupljeni seskviterpenski hidrokarbonati s E-kariofilenom kao vodećim spojem. Također je ta biljna vrsta bogata oksigeniranim seskviterpenima s kariofilen oksidom kao vodećim spojem, dok je monoterpenskih hidrokarbonata i oksigeniranih monoterpena nešto manje. Kod vrste *Micromeria dalmatica* Benth. utvrđena je visoka koncentracija pulegona u eteričnom ulju. To ulje gotovo u potpunosti čine monoterpeni, pretežno menton dok su većina identificiranih seskviterpena ugljikovodici. Također su prisutne u većoj mjeri masne kiseline i njima slične komponente (Radulović i Blagojević, 2012). Kod biljne vrste *Micromeria graeca* (L.) Rchb. dokazano je da je oksigenirani seskviterpen α-bisabol prevladavajuća komponenta u eteričnom ulju. Ulje je također sadržavalo veću koncentraciju oksigeniranih monoterpena s kamforom i trans-linalol oksidom kao vodećim spojevima. Najzastupljeniji oksigenirani seskviterpen je α-bisabol (Pavlinović, 2015).

Pregledom literturnih podataka o sastavu eteričnog ulja različitih vrsta biljaka iz roda *Micromeria* vidljiv je vrlo raznolik kemotipski sastav ulja. Kvantitativne i kvalitativne razlike

u sastavu ulja vrsta *Micromeria* ovise o zemljopisnim i klimatskim faktorima pa ih svrstavamo u posebne kemotipove. Znanstvena istraživanja su većinom posvećena utjecaju eteričnog ulja na pojedine bakterijske kulture, a naročito na gljivicu *Candida albicans*. Vrste roda najčešće se koriste u kulinarstvu kao začini ili napitci, ali i jako često u narodnoj medicini (Pavlinović, 2015).

Na sastav eteričnog ulja i produkciju sekundarnih metabolita utječu klimatski faktori, sastav tla i ostali ekološki faktori. Budući da se u ovom istraživanju radi o istom lokalitetu, ove dvije biljne vrste u usko srodne i po nekim autorima bi trebale biti podvrste jedna drugoj. Taksonomski položaj roda *Micromeria* i njemu vrlo bliskih rodova *Calamintha*, *Satureja*, *Clinopodium* i *Acinos*, nije potpuno definiran, pa je njihov položaj i odnosi među njima mijenjan više puta što upućuje na potrebu za istraživanjima filogenetskih odnosa da bi se odredile „granice“ među ovim vrstama. Prema Marin i sur. (2001) istraživači Bentham (1848) i Boissier (1879) su ih svrstali u tri roda: *Satureja, Micromeria* i *Calamintha*, s tim da su u zadnjem rodu *Clinopodium* i *Acinos.* Ovi podaci se slažu s istraživanjem mikromorfoloških obilježja i sastava eteričnog ulja biljnih vrsta *Micromeria kerneri* i *Micromeria juliana* provedeno 2013 (Kremer et al., 2014).

## 6. Zaključak

Rod *Micromeria* (Bentham, 1829.), rasprostranjen je od mediteranske regije do sjeverne Afrike, Indije i Kine. Ovaj rod pripada porodici usnjača, Lamiaceae i redu Lamiales. Također se svrstava u odjeljak sjemenjača (Spermatophyta). Rod *Micromeria* je polimorfan rod porodice Lamiace što znači da različite vrste roda imaju i različita morfološka obilježja. Prilikom analizu dviju biljnih vrsta *Micromeria kerneri* i *Micromeria juliana* utvrđena je uska srodnost ovih vrsta. . Kod biljke *Micromeria kerneri* sastav ulja je bio sljedeći:

- 1,5% monoterpenskih hidrokarbonata
- 32,4% oksigeniranih monoterpena
- 17% seskviterpenskih hidrokarbonata
- 34,4% oksigeniranih seskviterpena

- 2,2% fenolnih spojeva
- 0,8% karbonilni spojeva
- 1,7% hidrokarbonata

Analizom eteričnog ulja je utvrđeno prisustvo 42 kemijska spoja koji predstavljaju 90% ukupno identificiranih spojeva. Najzastupljeniji monoterpenski hidrokarbonata je terpinen (0,5%), oksigenirani monoterpen je verbenon (7%), seskviterpenski hidrokarbonat je germakren D, oksigenirani seskviterpen je kariofilen oksid koji je ujedno i najzastupljeniji spoj u sastavu eteričnog ulja kernerove bresine i predstavlja najviši pik na kromatogramu, najzastupljeniji fenolni spoj je karvakrol (1,1%), karbonilni spoj je 1-okten-3-ol i hidrokarbonat je heneikosan (0,9%).

Kod biljke *Micromeria juliana* sastav ulja je bio sljedeći:

- 10,3% monoterpenskih hidrokarbonata
- 26,4% oksigeniranih monoterpena
- 31,3% seskviterpenskih hidrokarbonata
- 23% oksigeniranih seskviterpena
- 2,4% fenolnih spojeva
- 0,6% karbonilnih spojeva
- 1,2% hidrokarbonata

Analizom eteričnog ulja je utvrđeno prisustvo 120 kemijskih spojeva koji predstavljaju 95,2% ukupno identificiranih spojeva. Najzastupljeniji monoterpenski hidrokarbonat je bio *β*-Pinen (3,2%), oksigenirani monoterpen je linalool (8,3%), seskviterpenski hidrokarbonat je *E*-kariofilen (16,2%) koji je i ujedno najzastupljeniji spoj u sastavu eteričnog ulja julijske bresine te predstavlja najviši pik na kromatogramu, najzastupljeniji oksigenirani seskviterpen je kariofilen oksid (15,3%), fenolni spoj je timol (1,2%), karbonilni spoj je 3-oktanolacetat (0,4%) i hidrokarbonat je tetrakosan (0,4%). Usporedbom sastava eteričnih ulja vidimo da su najviše razlike u:

- Monoterpenskih hidrokarbonatima. Vrsta *Micromeria juliana* je bogatija spojevima koji spadaju u skupinu monoterpenskih hidrokarbonata.
- Seskviterpenskim hidrokarbonatima. Vrsta *Micromeria juliana* je skoro dvostruka bogatija spojevima koji spadaju u skupinu seskviterpenskih hidrokarbonata.

- Oksigeniranim seskviterpenima. Vrsta *Micromeria kerneri* je bogatija spojevima koji spadaju u skupinu oksigeniranih seskviterpena.
- Najzastupljeniji spoj. Najzastupljeniji spoj kod biljke *Micromeria kerneri* je kariofilen oksid dok je kod biljke *Micromeria juliana* najzastupljeniji spoj *E*-kariofilen.

U obje biljne vrste najzastupljenije skupine spojeva su bile monoterpenski hidrokarbonati, oksigenirani monoterpeni, seskviterpenski hidrokarbonati i oksigenirani seskviterpeni. Najzastupljeniji spojevi su *E*-kariofilen i kariofilen oksid što ukazuje na srodnost ovih dviju vrsta.

# 7. Literatura


1. Adams R. P. 2007: Identification of essential oil components by gas chromatography and mass spectroscopy, Allured Publ., Corporation, Carol Stream, IL.
2. Arabaci T., Durmenci T., Celep F., 2010. Morphological character analysis in Turkish Micromeria species with a numerical taxonomic study.
3. Ali-Shtayeh, Yaghmour, R. M. R., Faidi, Y. R., Khalid, S., Al-Nuri, M. A., 1998: Antimicrobial Activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian Area.
4. Barkiđija, Nikolina, ANATOMSKA GRAĐA LISTA I SASTAV ETERIČNOG ULJA VRSTE Micromeria kerneri Murb. / diplomski rad. Split : Prirodoslovno matematički fakultet, 29. 10.2013., 49 str. Voditelj: Dunkić, Valerija.
5. Baytop, T., 1984. Turkiye' de Bitkiler ile Tedavi. Istanbul Univ. Yay. No. 2355, Istanbul No. 40.
6. Bezić, N. 2008: Opća botanika ( skripta).
7. Bohlman, J., Meyer-Gauen, G. and R. Croteau, 1998: Plant terpenoid syntheses: Molecular biology and phytogenic analysis. Biochemistry, 95 (8), 4126 – 4133.
8. Bruneton J., 1995: Pharmacology Phytocemistry Medical Plants. Lavoisier Publishing Inc, Paris.
9. Chater and Guinea 1972., J.D and R.A. Hill: Dictionary of Terpenoides. Chapman and Hall, London.

10. Devetak, Z., 1995: Eterična ulja i njihova biološka uloga. Radovi hrvatskog društva za znanost i umjetnost III, Sarajevo. 93 – 103.

11. Dewick, P. M., 1997: Medical Naturals Products, John Wiley & Sons, Chichester.

12. Domac, R., 2014: Flora Hrvatske. Školska knjiga, Zagreb.

13. Duru, E. M., Ozturk, M., Ugur, A., Ceylan, O., 2004: The constutuents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey.

14. Fahn, A., 1990: Plant anatomy. Pergamon Press Ltd. – Oxford.

15. Gershenzon, J., M. E. McConkey and R. B. Croteau, 2000: Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint. Plant Physiology, 122 (1), 205 – 214.

16. Hallahan, D.L., Gray, J.C. and J.A. Callow, 2000: Advances in Botanical Research incorporating Advances in Plant Pathology; Plant Trichomes. Vol. 31. Academic Press.
17. Heldt 2011. Plant biochemistry. Academic Press, Amsterdam.
18. Kalođera, Z., Jurišić, R., 1998: Kemizam eteričnih ulja i njihova upotreba. Prvi hrvatski simpozij. Aromaterapija Zaštita zdravlja i obogaćenje turističke ponude. Opatija, 5 – 7 travnja. 21 – 34.

19. Kremer et al., 2012. Micromorphological and Chemotaxonomical Traits of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott, Dario Kremer, Edith Stabentheiner, Valerija Dunkić, Ivan Dragojević Muller, Lovorka Vujić, Ivan Kosalec, Dalibor Ballian, Faruk Bogunić, Nada Bezić.
20. Kremer et al., 2014. Micromorphological Traits and Essential Oil contents of *Micromeria kerneri* Murb. and *Micromeria juliana* (L.) Benth. (Lamiaceae), Dario Kremer, Mirko Ruščić, Valerija Dunkić, Nada Bezić, Dalibor Ballian, Faruk Bogunić, Danijela Stešević, Ivan Kosalec, Edith Stabentheiner, Vlado Matevski.
21. Kovačić S., Nikolić T., Ruščić M., Milović M., Jasprica N., Bogdanović S., Topić J., Flora jadranske obale i otoka, 250 najčešćih vrsta. Školska knjiga, Zagreb, 2008.
22. Lahlou, M., 2004, a: Metods tu study the phytocemistry and bioactivity of essential oils. Phytoteraphy Research, 18 (6), 435 – 448.

23. Lange B. M., M. R. Wildung, D. McCaskill, and R. Croteau, 1998: A familyof transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. Biochemistry, 95 (5), 2100 – 2104.

24. Mahmound, S. S. and R. B. Croteau, 2002: Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. Review, Trend sin Plant Science, 1 – 8.

25. Mann, J., R. S. Davidson, J. B. Hobs., D. V. Banthorpe, J. B. Banthrope and J. B. Harborne, 1994: Natural Products. Longman, Harlow.

26. Marin, P. D., R. J. Grayer, N. C. Veitch, G. C. Kite and J. B. Harborne, 2001: Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria.* Phytochemistry, 58, 943-947.

27. McGarvey, D. J. and R. Croteau, 1995: Terpenoid Metabolism. The Plant Cell, 7, 1015 – 1026.

28. Pavlek–Kozlina, B., 2003: Fiziologija bilja. Profil. Zagreb.

29. Pavlinović, Mia, Rod *Micromeria* i sastav eteričnog ulja nekih vrsta iz roda *Micromeria*. Završni rad, Split 2015. Voditelj: Dunkić, Valerija.

30. Potočić, Z., 1980: Šumarska enciklopedija. Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb.

31. Rudall, P., 1992: Anatomy of flowering plants. University Press, Cambridge.

32. Schreier ,P., 1990: Chromatographic Studies of Biogenesis of Plant Volatiles, Dr. Alfred Huthing, Verlag, Heidelberg – Basel – New York, 1 – 15.

33. Radulović N.S., Blagojević P.D., 2012: Volatile secondary metabolites of *Micromeria dalmatica* Benth. Biosynthetical and Chemotaxonomical Aspects, Vol. 9

34. Schreier, P., 1984: Chromatographic Studies of Biogenesis of Plant Volatiles. Heidelber; Basel: New York. Hüthig.

35. Slavkovska, V., Couladis, M., Tzakou, O., Pavlovic, M., Lakusic, B., 2005: Essential oil and its systematic significance in species of Micromeria Bentham from Serbia and Montenegro.

36. Šilić, Č., 1979: Monografija rodova *Satureja* L., *Calamintha* Miller, *Micromeria* Bentham, *Acino*s Milleri *Clinopodium* L., u flori ex. Jugoslavije. Zemaljski muzej BIH – Sarajevo.

37. Wagner, H., 1993: Pharmazeutische Biologie, 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag – Studgart – New York, 55 – 65.

38. www.agr.hr/cro, posjećeno 01.07.2016.

39. www.google.hr, posjećeno 01.07.2016.

40. www.hirc.botanic.hr/floracroatica, posjećeno 01.07.2016.

41. www.kormofita-16-nikolic.hr posjećeno 01.07.2016.

42. www.zelje.arg.hr posjećeno 01.07.2016.

43. www.pmf.unizg.hr. Posjećeno 01.07.2016.

44. https://hr.wikipedia.org/wiki/Pijavi%C4%8Dino, posjećeno 07.07.2016.

# METODIČKI DIO

MENTOR: dr.sc. Mirko Ruščić

# PISANA PRIPREMA

| | | |
|---|---|---|
| STUDENT/ICA: Nikola Mušan | | datum: 15.07.2016. |
| MENTOR/ICA: doc. dr. sc. Mirko Ruščić | ŠKOLA: Gimnazija | razredni odjel: II |

NASTAVNI PREDMET: **BIOLOGIJA**

NASTAVNA CJELINA / TEMA: Kritosjemenjače

NASTAVNA JEDINICA: Usnjače *(Lamiaceae)*

CILJ SATA: Razvijanje sposobnosti prepoznavanja, sistematizacije i interpretacije osnovnih činjenica o eteričnim uljima, primjenjivanje stečenog znanja o kserofitskim osobinama na primjeru iz roda *Micromeria* porodice *Lamiaceae*.

Ishodi:

Učenici će nakon obrade nastavne jedinice „*Usnače"* biti u stanju:

I. Prepoznati, utvrditi i sistematizirati kserofitske osobine
II. Interpretirati osnovne činjenice o eteričnim uljima i njihovoj primjeni
III. Prepoznati morfološke značajke porodice *Lamiaceae*
IV. Razviti misaone senzorne i izražajne sposobnosti
V. Prepoznati važnost ekološke svijesti za floru Hrvatske
VI. Usporediti sastav ulja dvije biljne vrste
VII. Opisati dijelove lista
VIII. Razviti pravilan odnos o istraživanju u prirodi

IZVORI ZNANJA

- izvorna stvarnost: biljni materijal- Kernerova bresina*(Micromeria kerneri),* julijska bresina *(Micromeria juliana),* bočice eteričnog ulja, češer
- nastavna sredstva: slike, tekst iz udžbenika, power point prezentacija

NASTAVNA POMAGALA: ploča, kreda, računalo, LCD projektor, pokazivač

NASTAVNE METODE: metoda razgovora, metoda usmenog izlaganja, metoda demonstracije, metoda

| |
|---|
| pisanja, metoda rada na tekstu, metoda praktičnih radova-mikroskopiranje |
| OBLICI RADA: individualni oblik rada, frontalni oblik rada, rad u skupinama<br><br>TIP SATA: sat obrade novih nastavnih sadržaja |
| Razine znanje: R1 – pamćenje, R2 – razumjevanje i primjena, R3 – rješavanje problema |
| KORELACIJA:<br><br>- Kemija (destilacija, ekstrakcija, sastav eteričnog ulja)<br><br>- Biologija 3 (živčani sustav- prijenos mirisa živčanim putem)<br><br>- Hrvatski jezik (pravilno izražavanje)<br><br>- Zemljopis (rasprostranjenost vrsta na Zemlji) |

| ETAPA SATA (vrijeme) | **ARTIKULACIJA NASTAVNOG SATA** |
|---|---|
| Metoda razgovora<br><br>Frontalni oblik rada<br><br>Metoda demonstracije | **Uvod (5 min.):**<br><br>- Na koje dvije velike skupine smo podijelili sjemenjače? (R1)<br><br>(*Kritosjemenjače i golosjemenjače*)<br><br>- Usporedite golosjemenjače i kritosjemenjače koristeći se izvornom stvarnošću (češer, plod biljke dvosupnice)! (R2)<br><br>*( Kritosjemenjače imaju sjemeni zametak zatvoren u plodnici tučka i sjemenke u usplođu ploda dok su kod golosjemenjača sjemeni zametak i sjemenke nezaštićeni. Kod kritosjemenjača nailazimo na reducirani (smanjeni) gametofit i na pravi cvijet i plod.)*<br><br>- Koja podjela postoji unutar razreda kritosjemenjača*?*(R1)<br><br>*(Razred dijelimo na jednosupnice i dvosupnice.* |

| | |
|---|---|
| | **Glavni dio (30 min.):** |
| | Najava cilja i zapis na ploči: |
| | - Danas ćemo govoriti o porodici usnača ili *Lamiaceae.* |
| | (zapis na ploči) |
| | (pokazati herbarizirani primjerak vrste kernerova bresina) |
| | - Je li vam poznata ova biljka? (R1) |
| Metoda razgovora | -Znate li njezino ime? (R1) |
| | Vrsta *Micromeria kerneri* Murb. (Kernerova bresina) rasprostranjena je na velebitskom primorju, dalmatinskoj Zagori, Hercegovini, Boki Kotorskoj na brdima jugoistočnog dijela otoka Krka i južne klisure susjednog Prvića. |
| Metoda demonstracije | - Navedite glavne morfološke osobine Kernerove bresine! (R2) |
| | (*Od vegetitavnih organa vidljivi su list, korijen i stabljika* (zapis na ploči) |
| Metoda razgovora | (*Od generativnih organa uočavamo cvijet i plod* (zapis na ploči) |
| Frontalni rad | Slijedi rad u skupinama. Formirajte 5 skupina. |
| | Dobit ćete primjerke herbariziranih biljaka i upute za rad svake skupine. Svi podjednako sudjelujte u obavljanju zadatka jer će po jedan učenik iz svake skupine biti izabran za izlaganje. |
| | SKUPINA 1. Proučite i opišite izgled lista biljke! |
| | SKUPINA 2. Proučite i opišite izgled stabljike biljke! |
| | SKUPINA 3. Proučite i opišite izgled korijena biljke! |
| | SKUPINA 4. Proučite i opišite izgled cvata (cvijeta) biljke! |
| Rad u skupini | SKUPINA 5. Napraviti prerez lista kernerove i julijske bresine. Potrebno je napraviti preparat i mikroskopirati žljezdanje dlake ovih biljaka. Svi učenici se ustaju s svog |

| | |
|---|---|
| | mjesta da pogledaju sliku na mikroskopu.<br><br>Nakon završetka izabrati učenika iz skupine i zamoliti ga da prezentira rad ostalim učenicima.<br><br>- Pomirišite biljku! Osjećate li miris? (R1)<br><br>- Možete li zaključiti zašto biljka miriše? (R2)<br><br>(*Zbog eteričnih ulja*) (zapis na ploči)<br><br>- Pokušajte objasniti pojam „eterično ulje“! (R2)<br><br>*(Eterična ulja su visoko koncentrirane smjese velikog broja različitih organskih spojeva dobivenih iz određenih dijelova biljke. Najčešće komponente su terpenski derivati, alkoholi, aldehidi, esteri, fenoli itd.. Neka ulja sadrže i do 250 različitih komponenti.)* |
| Metoda razgovora | - Eterična ulja luče žlijezde odnosno žlijezdane dlake. Znate li za neku od primjena eteričnih ulja? (R2)<br><br>*(Koriste se za oplemenjivanje prostora, u medicini, kozmetičkoj industriji, u kulinarstvu kao začin itd.)* |
| Frontalni rad<br><br>Metoda razgovora | - Možemo li eterična ulja koristiti neograničeno? (R2)(*Možemo, jer su 100 % prirodna, ali ipak kod nekih treba pripaziti. Ne preporuča se uzimanje eteričnih ulja oralnim putem jer jedna kap ulja može odgovarati količini od 50 g cijele biljke.)*<br><br>- Postoje li rizične skupine kod korištenja eteričnih ulja? (R2)( *Da, trudnice, mala djeca, starije osobe i astmatičari moraju pripaziti pri korištenju.)*<br><br>Poznajete li neke od načina dobivanja eteričnog ulja iz biljke? (R2)*(Razne vrste destilacije, ekstrakcija pomoću otapala, prešanje. Najčešće se koristi postupak destilacije vodenom parom koji se izvodi na temperaturi 95-99 °C, a koristi se kod biljaka koje se raspadaju na temperaturi vrenja.)*<br><br>- Jesu li sva eterična ulja prirodna? (R2)<br><br>(*Nisu, danas je usavršen postupak proizvodnje savršenih kopija eteričnih ulja iz sintetskih sirovina (*zapis na ploči). *Ako je ulje tzv. aromaterapijske kvalitete na* |

| | |
|---|---|
| Metoda razgovora<br><br>Metoda demonstracije | *bočici će biti navedeno latinsko ima roda i vrste biljke, dio biljke iz kojeg je ulje dobiveno, glavne sastavnice (kemotip ulja), način uzgoja biljke itd. Ako na etiketi ili certifikatu nema takvih podataka, velika je mogućnost da se radi o ulju koje nije prirodno.)*<br>- Eterično ulje Kernerove i julijske bresine *(Micromeria juliana, Micromeria kerneri* ) izolirali smo iz biljnog materijala vodenom destilacijom u aparaturi po Clevenger-u. Izolacija traje 3 sata. (demonstrirati, označiti dijelove aparature, zapis na ploči)<br>Koristili smo 100 g suhog biljnog materijala na 500 ml vode. Zbog mogućih gubitaka otopljenih, hlapljivih spojeva u vodi, u unutarnji dio graduirane cijevi dodali smo 2 ml pentana. Nakon završetka destilacije, otopinu ulja u pentanu odijeljena je od vode.<br><br>**Ponavljanje (10 min.):**<br><br>Sada ću svakoj skupini podijeliti tri primjerka herbarizirane biljke iz porodice usnača *(Lamiaceae*) i po bočicu eteričnog ulja.<br><br>Na temelju izgleda biljke i mirisa eteričnog ulja utvrdite pripadnost ulja određenoj vrsti.<br><br>Podijeliti ću učenicima radne listiće sa zadacima za ponavljanje naučenog sadržaja. |

| | |
|---|---|
| Metoda demonstracije<br><br>Rad u skupini | |

**PRIKAZ SADRŽAJA NA ŠKOLSKOJ PLOČI**

**DVOSUPNICE-USNJAČE-LAMIACEAE**

KERNEROVA BRESINA — JULIJSKA BRESINA

*Micromeria kerneri* Murb. - *Micromeria juliana* (L.) Benth. ex Rchb.

- vegetativni organi: stabljika
  list
  korijen
- generativni organi: cvijet (cvat)
  plod

ETERIČNO ULJE

- oplemenjivanje prostora
- medicina
- kozmetička industrija
- kulinarstvo

- metode dobivanja: destilacija vodenom parom

  ekstrakcija pomoću otapala

  prešanje

- vrste: prirodno

  sintetsko

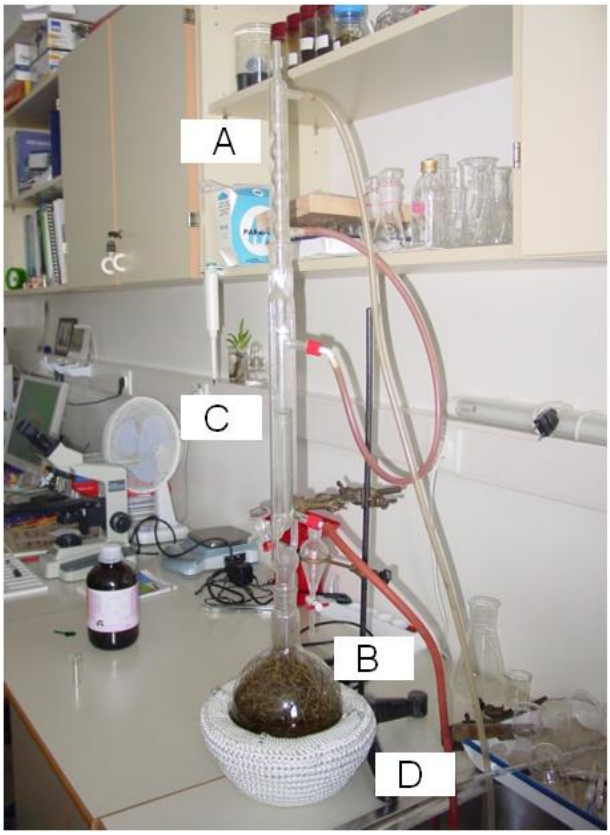
**PRIKAZ POWER POINT PREZENTACIJE**



*Micromeria juliana*



*Micromeria kerneri*




Aparatura po Clevenger-u

A- hladilo

B- tikvica

C- graduirana cijev aparata po Clevenger-u

D- kalota

**RADNI LISTIĆ:**

Zaokružite točan odgovor!

**1.** Kojem odjeljku pripada kernerova bresina? R1. (Ishod I.)

a) mahovinama

b) papratnjačama

c) sjemenjačama

d) algama

Točan odgovor: c)

**2.**Kojoj porodici pripada Kernerova bresina? R1 (Ishod III.)

a) *Polygonaceae*

b) *Apiaceae*

c) *Lamiaceae*

d) *Plumbaginaceae*

Točan odgovor: c)

**3.** Povežite slijedeće pojmove! R2 (Ishod I. i II.)

| | |
|---|---|
| 1. kernerova bresina | a) žlijezdane dlake |
| 2. eterično ulja | b) velebitsko primorje |
| 3. reducirani | c) gametofit |

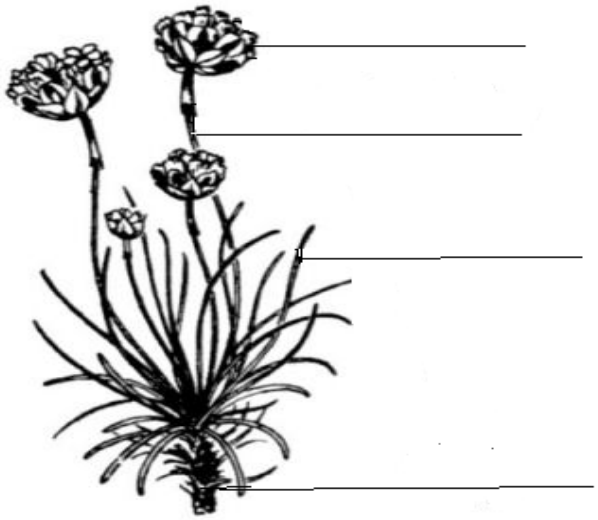
Točan odgovor: 1b), 2a), 3c).

**4.** Nadopunite slijedeće rečenice! R2 (Ishod II. I VIII.)

Terpenski derivati su jedna od komponenti _____.

Zbog mogućih gubitaka _____ u vodi, u unutarnji dio graduirane cijevi stavljamo _____.

**5.** Na slici označite vidljive vegetativne i generativne organe i odgovori na pitanja! R2, R3 (Ishod III. i VII.)



a) Kakvog je oblika list kod biljke na slici?

b) Opišite izgled stabljike!

LITERATURA, IZVORI ZA UČENIKA:

- Habdija, I. 2009: Biologija 2, svezak B: Životinjski svijet, udžbenik iz biologija za drugi razred gimnazije, Profil, Zagreb

LITERATURA, IZVORI ZA NASTAVNIKA:

STRUČNA:

- Habdija, I. 2009:Biologija 2, svezak B: Životinjski svijet, udžbenik iz biologija za drugi razred gimnazije, Profil, Zagreb
- 
- Pavletić, Z.,1997: Biologija 2. Svezak A: Prokarioti,gljive i biljke, Profil,Zagreb.