

Kemijski sastav i biološka aktivnost eteričnog ulja iz iglica čempresa, gluhača i alepskog bora

Vučković, Ana

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:167:012506>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET

**KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNOG
ULJA IZ IGLICA ČEMPRESA, GLUHAČA I ALEPSKOG BORA**

DIPLOMSKI RAD

ANA VUČKOVIĆ

Matični broj: 87

Split, listopad 2019.

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

**KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNOG
ULJA IZ IGLICA ČEMPRESA, GLUHAČA I ALEPSKOG BORA**

DIPLOMSKI RAD

ANA VUČKOVIĆ

Matični broj: 87

Split, listopad 2019.

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

**CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF
ESSENTIAL OIL FROM NEEDLES OF SELECTED PLANTS
FROM MEDITERRANEAN CYPRESS, PHOENICEAN JUNIPER
AND ALEPPO PINE**

MASTER'S THESIS

ANA VUČKOVIĆ

Parent number: 87

Split, October 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemija; Smjer: Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

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

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

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA IZ IGLICA ČEMPRESA, GLUHAČA I ALEPSKOG BORA

Ana Vučković, 87

Sažetak: Eterična ulja iz iglica čempresa (*Cupressus sempervirens* L.), gluhača ili primorske somine (*Juniperus phoenicea* L.) iz porodice čempresovki (Cupressaceae) te alepskog bora (*Pinus halepensis* Miller) iz porodice borovki (Pinaceae) izolirana su metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru. Kemijски sastav izoliranih ulja je određen pomoću vezanog sustava plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Najzastupljeniji spoj kod eteričnih ulja čempresa i gluhača bio je monoterpen α -pinen (32,75 % i 61,34 %), a kod alepskog bora diterpen kaur-16-en (16,77 %). Ispitana je antioksidacijska aktivnost navedenih eteričnih ulja kao i sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze. Ulja nisu pokazala značajnu antioksidacijsku aktivnost, dok su pokazala inhibicijsku aktivnost na acetyl- i butirilkolinesterazu. Eterično ulje alepskog bora pokazalo je najveću inhibicijsku aktivnost na acetilkolinesterazu, a eterično ulje čempresa na butirilkolinesterazu. Ispitana je i antimikrobna aktivnost metodom mikrodilucije te je utvrđeno da eterična ulja nemaju značajnu antimikrobnu aktivnost, ali pokazuju jaku antifungalnu aktivnost.

Ključne riječi: čempres, gluhač, alepski bor, eterično ulje, GC-MS, inhibicija kolinesteraza, antimikrobna aktivnost

Rad sadrži: 74 stranice, 62 slike, 14 tablica, 53 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević | - predsjednik |
| 2. Izv. prof. dr. sc. Ana Maravić | - član |
| 3. Doc. dr. sc. Franko Burčul | - član - mentor |

Datum obrane: 10. listopada 2019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

MASTER'S 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: Franko Burčul, PhD, Assistant Professor, Ana Maravić, PhD, Associate Professor

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM NEEDLES OF SELECTED PLANTS FROM MEDITERRANEAN CYPRESS, PHOENICEAN JUNIPER AND ALEPPO PINE

Ana Vučković, 87

Abstract: Essential oils from needles of Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L., Cupressaceae) and the Phoenician juniper (*Juniperus phoenicea* L., Cupressaceae) as well as the Aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller, Pinaceae) were isolated using water distillation in the Clevenger type apparatus. Their chemical composition was determined using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. The results showed that monoterpene α -pinene is the most abundant compound in essential oils of Mediterranean cypress and the Phoenician juniper (32,75 % i 61,34 %), and diterpene kaur-16-ene in the Aleppo pine essential oil (16,77 %). The antioxidant activity of essential oils was tested as well as their acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activity. Aleppo pine essential oil showed the highest inhibitory activity on acetylcholinesterase, and Mediterranean cypress essential oil on butyrylcholinesterase. Antimicrobial activity was tested by the microdilution method and it was found that essential oils do not have significant antimicrobial activity but they showed high antifungal activity.

Keywords: Mediterranean cypress, Phoenician juniper, Aleppo pine, essential oil, GC-MS, cholinesterase inhibition, antimicrobial activity

Thesis contains: 74 pages, 62 figures, 14 tables, 53 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|-------------------|
| 1. Ivica Blažević, PhD, Associate Professor | - chair person |
| 2. Ana Maravić, PhD, Associate Professor | - member |
| 3. Franko Burčul, PhD, Assistant Professor | - member - mentor |

Defence date: October 10, 2019.

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula te na Odjelu za biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu pod komentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Maravić od veljače do rujna 2019. godine.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-6897.

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Franku Burčulu i komentorici doc. dr. sc. Ani Maravić na stručnim i korisnim savjetima te velikoj pomoći pri izradi ovog rada. Posebno se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Mirku Ruščiću na pomoći prilikom sakupljanja i identifikacije biljnog materijala te laborantu Vladimiru Jelaski Relji na pomoći u laboratoriju za biokemiju.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na podršci.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- 1. Izolacija eteričnog ulja iz iglica čempresa, gluhača i alepskog bora vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru.*
- 2. Određivanje kemijskog sastava eteričnih ulja vezanim sustavom GC-MS.*
- 3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti eteričnih ulja pomoću DPPH i FRAP metoda.*
- 4. Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze dobivenim eteričnim uljima metodom po Ellmanu.*
- 5. Određivanje antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja metodom mikrodilucije.*

SAŽETAK

Eterična ulja iz iglica čempresa (*Cupressus sempervirens* L.), gluhača ili primorske somine (*Juniperus phoenicea* L.) iz porodice čempresovki (Cupressaceae) te alepskog bora (*Pinus halepensis* Miller) iz porodice borovki (Pinaceae) izolirana su metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru. Kemijski sastav izoliranih ulja je određen pomoću vezanog sustava plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Najzastupljeniji spoj kod eteričnih ulja čempresa i gluhača bio je monoterpen α -pinen (32,75 % i 61,34 %), a kod alepskog bora diterpen kaur-16-en (16,77 %). Ispitana je antioksidacijska aktivnost navedenih eteričnih ulja kao i sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze. Ulja nisu pokazala značajnu antioksidacijsku aktivnost, dok su pokazala inhibicijsku aktivnost na acetyl- i butirilkolinesterazu. Eterično ulje alepskog bora pokazalo je najveću inhibicijsku aktivnost na acetilkolinesterazu, a eterično ulje čempresa na butirilkolinesterazu. Ispitana je i antimikrobna aktivnost metodom mikrodilucije te je utvrđeno da eterična ulja nemaju značajnu antimikrobnu aktivnost, ali pokazuju jaku antifungalnu aktivnost.

Ključne riječi: čempres, gluhač, alepski bor, eterično ulje, GC-MS, inhibicija kolinesteraza, antimikrobna aktivnost

SUMMARY

Essential oils from needles of Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L., Cupressaceae) and the Phoenician juniper (*Juniperus phoenicea* L., Cupressaceae) as well as the Aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller, Pinaceae) were isolated using water distillation in the Clevenger type apparatus. Their chemical composition was determined using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. The results showed that monoterpene α -pinene is the most abundant compound in essential oils of Mediterranean cypress and the Phoenician juniper (32,75 % i 61,34 %), and diterpene kaur-16-ene in the Aleppo pine essential oil (16,77 %). The antioxidant activity of essential oils was tested as well as their acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activity. Aleppo pine essential oil showed the highest inhibitory activity on acetylcholinesterase, and Mediterranean cypress essential oil on butyrylcholinesterase. Antimicrobial activity was tested by the microdilution method and it was found that essential oils do not have significant antimicrobial activity but they showed high antifungal activity.

Keywords: Mediterranean cypress, Phoenician juniper, Aleppo pine, essential oil, GC-MS, cholinesterase inhibition, antimicrobial activity

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Porodica čempresovki (Cupressaceae).....	2
1.1.1. Čempres (<i>Cupressus sempervirens</i> L.).....	2
1.1.2. Gluhač (<i>Juniperus phoenicea</i> L.).....	3
1.2. Porodica borovki (Pinaceae).....	4
1.2.1. Alepski bor (<i>Pinus halepensis</i> Miller).....	4
1.3. Eterična ulja i njihov kemijski sastav	5
1.3.1. Terpeni	6
1.3.2. Fenilpropanski derivati	10
1.2.3. Ostali spojevi eteričnih ulja	10
1.4. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom.....	11
1.5. Kemijska analiza eteričnih ulja	13
1.5.1. Kromatografske metode.....	13
1.5.2. Spektrometrija masa (MS).....	16
1.5.3. Vezani sustav GC-MS	18
1.6. Slobodni radikali i oksidacijski stres.....	18
1.7. Antioksidansi i antioksidacijsko djelovanje.....	19
1.7.1. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava	20
1.8. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze	22
1.8.1. Acetilkinolin i acetilkolinesteraza.....	22
1.9. Sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze	24
1.9.2. Butirilkolin i butirilkolinesteraza	24
1.10. Antimikrobna aktivnost.....	26
1.10.1. Antimikrobni potencijal eteričnih ulja	26
1.10.2. Dilucijske metode.....	26
1.10.3. Korišteni sojevi mikroorganizama	27
2. EKSPERIMENTALNI DIO	31
2.1. Prikupljanje, sušenje i skladištenje biljnog materijala	31
2.2. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom.....	32
2.4. Pribor i kemikalije.....	36
2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	37
2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	38
2.7. Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze	39
2.8. Ispitivanje sposobnosti inhibicije butirilkolinesteraze	41

2.9. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom mikrodilucije	43
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	47
3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja	47
3.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja iz iglica čempresa (<i>C. sempervirens</i>).....	47
3.1.2. Kemijski sastav eteričnog ulja iz iglica gluhača (<i>J. phoenicea</i>).....	51
3.1.3. Kemijski sastav eteričnog ulja iz iglica alepskog bora (<i>P. halepensis</i>)	54
3.2. Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja određena FRAP metodom	61
3.3. Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja određena DPPH metodom	62
3.4. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze	62
3.5. Sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze.....	65
3.6. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja određena metodom disk difuzije.....	66
4. ZAKLJUČCI.....	70
5. LITERATURA	71

UVOD

Čempres (*Cupressus sempervirens* L.) je zimzeleno stablo iz porodice čempresovki (Cupressaceae), njegovo eterično ulje koristi se kod problema s venama, hemoroidima te kao limfotonik. Gluhač ili primorska somina (*Juniperus phoenicea* L.) je niže zimzeleno stablo iz porodice čempresovki (Cupressaceae), a njegovo eterično ulje koristi se kod plućnih bolesti i kao diuretik. Alepski bor (*Pinus halepensis* Miller) je zimzeleno stablo iz porodice borovki (Pinaceae). Eterično ulje bora od davnina se upotrebljavalo u liječenju pluća, a njegovo povoljno djelovanje na dišne organe znanstveno je dokazano. Sve tri vrste su prirodno rasprostranjene na području Sredozemlja.

Eterična ulja su smjese hlapljivih spojeva iz biljnog materijala koje se dobivaju metodama destilacije ili prešanjem epikarpa voća iz roda *Citrus*. Nalaze se u različitim dijelovima biljke: korijenu, cvijetu, listu, plodu i sjemenkama. Temperatura vrelišta im je u rasponu od 150 do 300 °C.

U ovom radu eterična ulja izolirana su metodom vodene destilacije u aparaturi po Clevengeru, određen im je kemijski sastav plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (GC-MS), dvjema tehnikama koje se međusobno izvrsno nadopunjuju u identifikaciji sastojaka smjese hlapljivih spojeva. Ispitivana su i antioksidacijska svojstva pomoću FRAP i DPPH spektrofotometrijskih metoda te sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze koja je, također, određena spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu. Antimikrobna aktivnost određena je metodom mikrodilucije.

1. OPĆI DIO

1.1. Porodica čempresovki (Cupressaceae)

Čempresovke (Cupressaceae) su biljna porodica iz reda borolike, nekad klasificirane u vlastitom redu čempresolike (Cupressales). Porodici pripadaju 32 priznata roda sa 166 priznatih vrsta, drveća i grmlja: čempres (*Cupressus*), kleka (*Juniperus*), tuja (*Thuja*), sekvoja (*Sequoia*) i mamutovac (*Sequoiadendron*).¹

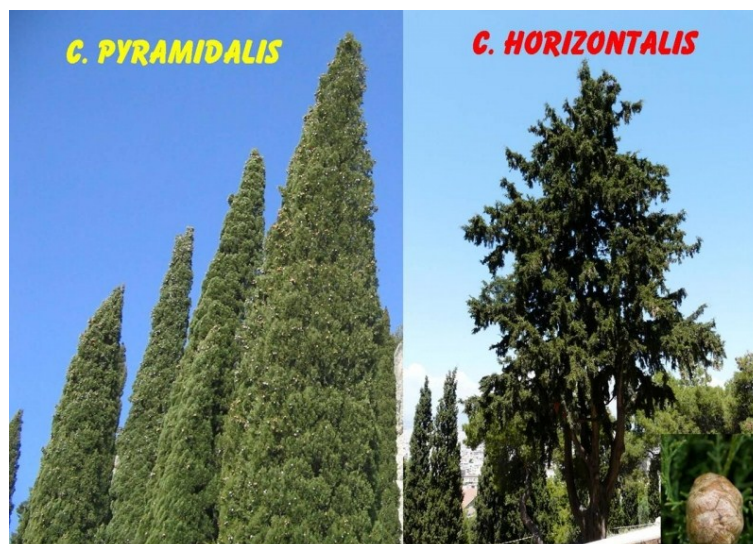
Tablica 1. Sistematika porodice čempresovki (Cupressaceae)¹

SISTEMATIKA	NAZIV
Carstvo:	Plantae
Divizija:	Tracheophyta
Razred:	Pinopsida
Red:	Pinales
Porodica:	Cupressaceae

1.1.1. Čempres (*Cupressus sempervirens* L.)

Čempres (*Cupressus sempervirens* L.) je zimzeleno stablo iz porodice čempresovki (Cupressaceae) koje može narasti i do 35 metara. Deblo je uspravno, kora debela, a grančice tanke. Listovi su tamnozeleni, uski i kratki, a sadrže smolne žlijezde. Cvjetovi su jednospolni, a muški i ženski cvjetovi se nalaze na istom stablu te cvatu u proljeće, u periodu od ožujka do svibnja. Češeri su veličine 3-4 cm, kuglastog oblika, a sastoje se od 8-14 ljusaka. Čempres raste brzo, nije osjetljiv na vrstu tla, otporan je na visoke temperature i sušu. Postoje dvije forme ove vrste:

- var. *pyramidalis* - grane su uspravne i priljubljene uz deblo i ima gustu piramidalnu krošnju
- var. *horizontalis* - grane su usmjerene horizontalno i ima široku krošnju²



Slika 1. Razlike dviju sorti čempresa (*Cupressus sempervirens* L. var. *pyramidalis* i var. *horizontalis*)³

Čempres je prirodno rasprostranjen na području istočnog Sredozemlja, a na području Dalmacije se smatra autohtonom vrstom. Koristi se kao ukrasno stablo u vrtovima i parkovima, a uzgaja se i na grobljima jer grčka mitologija povezuje čempres s Hadom, bogom podzemlja i mrtvih. Medonosna je biljka jer pčelama daje mnogo peluda. Eterično ulje čempresa se koristi kod problema s venama, hemoroidima te kao limfotonik.²

1.1.2. Gluhač (*Juniperus phoenicea* L.)

Gluhač ili primorska somina (*Juniperus phoenicea* L.) je niže zimzeleno stablo iz porodice čempresovki (Cupressaceae) koje raste do 8 metara. Krošnja je gusta, okrugla i sadrži tanke horizontalne grane. Igljice su svijetlozelene boje, duge 8 mm. Muški i ženski cvjetovi rastu na različitim stablima, a cvatu u periodu od veljače do travnja. Češeri su mali, okrugli, narastu do 1,5 cm. Gluhač je rasprostranjen na području oko Mediterana, kod nas raste samo u priobalnom području, na kamenjarskim mjestima. Latinsko ime roda *Juniperus* potječe od riječi *juvenus* (mlad) i *parere* (roditi) jer se somina koristila kao sredstvo za abortus. Eterično ulje gluhača koristi se kod plućnih bolesti i kao diuretik.^{4,5}



Slika 2. Gluhač ili primorska somina (*Juniperus phoenicea* L.)⁶

1.2. Porodica borovki (Pinaceae)

Borovke (Pinaceae) su biljna porodica četinjača. Porodica borovki (Pinaceae) dijeli se na četiri potporodice (Abietoideae, Piceoideae, Pineoideae i Laricoideae) i obuhvaća jedanaest rodova s oko 230 vrsta.⁷

Tablica 2. Sistematika porodice borovki (Pinaceae)⁷

SISTEMATIKA	NAZIV
Carstvo:	Plantae
Divizija:	Pinophyta
Razred:	Pinopsida
Red:	Pinales
Porodica:	Pinaceae

1.2.1. Alepski bor (*Pinus halepensis* Miller)

Alepski bor (*Pinus halepensis* Miller) je zimzeleno stablo iz porodice borovki (Pinaceae) koje može narasti do 20 metara. Deblo i grane su zakrivljene, a krošnja je nepravilna oblika. Listovi su igličasti, tanki, dugi, plavkastozeleni, dužine 6-15 cm.

Cvjetovi su jednospolni, a cvatu u travnju i svibnju. Češeri su viseći, jajastog oblika, dužine 5-10 cm. Alepski bor je rasprostranjen na području oko Sredozemlja, kod nas raste u srednjoj i južnoj Dalmaciji. Prilagođava se raznim tipovima zemljišta, otporan je na sušu i jake vjetrove, a odgovaraju mu svjetlost i toplina. Brzo raste i živi od 150 do 200 godina. Koristi se kao ukrasno stablo u parkovima i nasadima. Ime vrste *halepensis* potječe od najnaseljenijeg grada u Siriji, Alepa, gdje je biljka prvi put primijećena. Eterično ulje bora od davnina se upotrebljavalo u liječenju pluća, a njegovo povoljno djelovanje na dišne organe znanstveno je dokazano.⁸



Slika 3. Alepski bor (*Pinus halepensis* Miller)⁹

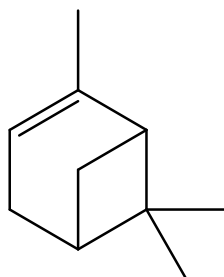
1.3. Eterična ulja i njihov kemijski sastav

Eterična ulja (engl. *essential oils*) su više ili manje složene smjese isparljivih spojeva koje se odlikuju intenzivnim karakterističnim mirisima. Dobivaju se iz cvjetova, listova ili plodova biljaka, a rjeđe iz kore ili korijena. Eterična ulja imaju poseban status među biljnim ekstraktima mirisnih osobina, ljekovitih svojstava, cijene te činjenice da se iz velike količine biljnog materijala dobije vrlo mali volumen eteričnog ulja. Većinom su bezbojna, žućkasta ili tamnosmeđa, ali određena ulja mogu imati karakteristične boje

(npr. modro ulje kamilice). Teško su topljiva u vodi, a kod sobne temperature su u pravilu tekuća i lakša od vode. Temperatura vrelišta im je u rasponu od 150 do 300 °C. Eteričnim uljima smiju se nazivati samo oni ekstrakti koji se dobivaju fizikalnim postupcima izolacije: destilacijom iz aromatičnog bilja (mirisave biljke s većim sadržajem eteričnog ulja) i prešanjem epikarpa voća iz roda *Citrus*. Pripadaju različitim skupinama organskih spojeva, kao što su ugljikovodici, ketoni, oksidi i aldehidi te njihov miris uvelike ovisi o kemijskom sastavu.^{10,11}

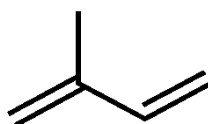
1.3.1. Terpeni

Terpeni (engl. *terpenes*) su glavni i najzastupljeniji spojevi tipičnih eteričnih ulja. Naziv potječe od činjenice da su to zapravo prvi spojevi koji su izolirani iz terpentina, ulja koje se dobiva destilacijom smole bora (tzv. terpentinsko ulje), čiji je glavni spoj α -pinen (slika 4.).



Slika 4. Struktura α -pinena¹⁰

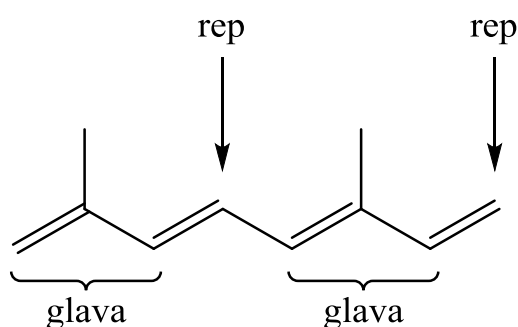
Wallach je 1881. god. utvrdio izopren (po IUPAC-u 2-metilbuta-1,3-dien) kao strukturnu jedinicu zajedničku svim terpenima, a koji se kraće označava C_5 -jedinicom (slika 5.).



Slika 5. Struktura izoprena (C_5H_8)¹⁰

Također je predložio građu pravilnih terpena (izoprensko pravilo) od izoprenskih jedinica povezanih "glava na rep" (engl. *head to tail*). Dakle, kod pravilnih terpena

razgranati završetak jedne C₅-jedinice (glava) povezan je na nerazgranati završetak druge C₅-jedinice (rep).



Slika 6. Izoprensko pravilo

Osim pravilnih terpena postoje i nepravilni terpeni koji su građeni od izoprenskih jedinica povezanih na drugi način, npr. "glava na glavu" ili "rep na rep". Podjela terpena prema broju izoprenskih jedinica prikazana je u tablici 3.

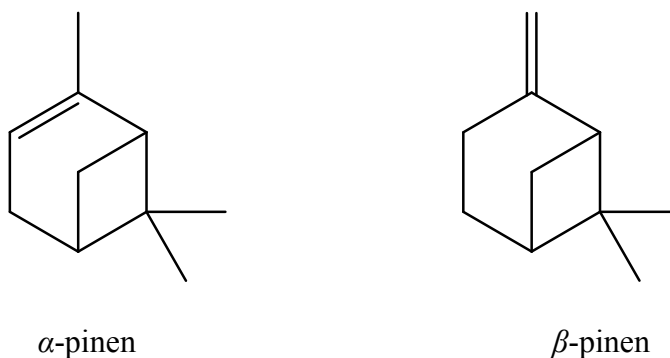
Tablica 3. Podjela terpena prema broju ugljikovih atoma, tj. izoprenskih jedinica.¹⁰

VRSTA TERPENA	BROJ C-ATOMA	BROJ IZOPRENSKIH JEDINICA	ULOGA U ORGANIZMU ILI ODABRANI PRIMJERI
semiterpeni	5	1	biljni hormoni, feromoni
monoterpeni	10	2	feromoni, obrambeni sekreti
seskviterpeni	15	3	fitoaleksini (stresni metaboliti)
diterpeni	20	4	npr. fitol (lipofilni lanac klorofila)
triterpeni	30	6	steroidni (hormoni, saponini) i nesteroidni (izvode se iz skvalena)
tetraterpeni	40	8	karotenoidi (karoteni, ksantofili)
politerpeni	5n	n	prirodne gume

Nadalje, terpeni se još mogu podijeliti na cikličke i acikličke, a prema funkcijskim skupinama mogu biti terpeni ugljikovodici, alkoholi, fenoli, kiseline, esteri, aldehidi, ketoni i drugi, uključujući i organske polifunkcijske spojeve.

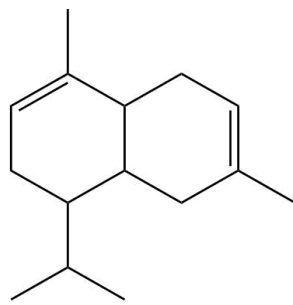
Samo je nekoliko prirodnih semiterpena danas poznato. Osim izoprena, poznati su i izopentanol te 3,3-dimetilalil-alkohol koji se javljaju u eteričnim uljima ili slobodni ili u obliku estera. Prilikom obrade biljnih uzoraka i izolacije eteričnog ulja mogući značajni gubici ovih spojeva jer su izuzetno isparljivi.

Monoterpeni i seskviterpeni su hlapljivi spojevi manje molekulske mase i glavni su sastojci eteričnih ulja. Monoterpeni su spojevi koji sadrže 10 ugljikovih atoma i služe kao obrambeni sekreti biljke. Biosintetski nastaju iz geranil-pirofosfata (GPP). Najpoznatiji su α - i β -pinen (slika 7.), a neki od ostalih predstavnika monoterpena su: limonen, α -terpinen, kamfor, α -tujen, sabinen i dr.

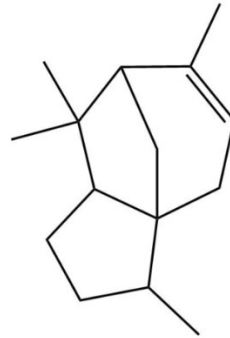


Slika 7. Strukture α - i β -pinena¹⁰

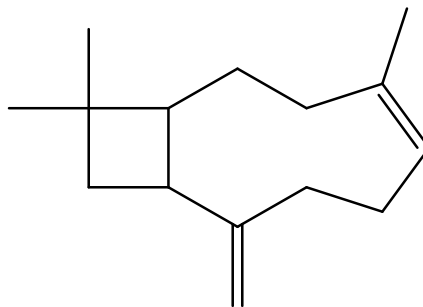
Seskviterpeni su spojevi koji sadrže 15 ugljikovih atoma, reguliraju rast biljke, manje su isparljivi od monoterpena i količinski su manje zastupljeni od monoterpena u eteričnim uljima. Biosintetski nastaju iz farnezil-pirofosfata (FPP). Neki od predstavnika ove skupine su: β -kadinen, α -cedren i kariofilen (slika 8.).



β -kadinen



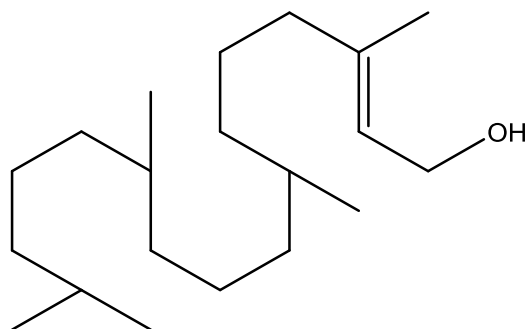
α -cedren



kariofilen

Slika 8. Strukture predstavnika seskviterpena¹⁰

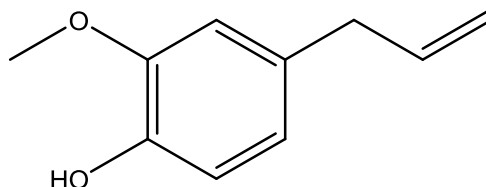
Diterpeni su spojevi koji se sastoje od 20 ugljikovih atoma, prirodi se vrlo rijetko nalaze kao sastojci eteričnih ulja, češće su sastojci smola. Predstavnik diterpena je fitol (slika 10.).¹⁰



Slika 9. Struktura fitola¹⁰

1.3.2. Fenilpropanski derivati

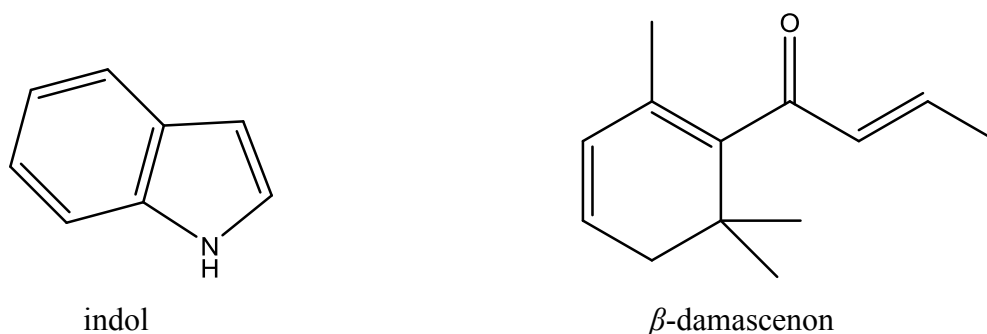
Fenilpropanski derivati (engl. *phenylpropane derivatives*) su skupina prirodnih organskih spojeva koji sadrže fenilni prsten s jednim bočnim lancem od tri ugljikova atoma (propilni lanac). Mogu biti aldehidi, fenoli, fenileteri koji se izvode iz cimetine kiseline. Osnovu njihove građe čine aminokiseline fenilalanin i tirozin iz kojih ovi spojevi nastaju biosintetskim putem. Posebnu grupu fenilpropanskih derivata čine spojevi sa skraćenim ili eliminiranim bočnim lancem. Takvoj grupi pripadaju fenilkarboksilne kiseline ili jednostavni fenoli. Karakteristični primjeri fenilpropanskih derivata iz eteričnih ulja su: benzil-alkohol, benzaldehid, eugenol, anetol, cimetni aldehid, apiol i dr. Eugenol je spoj ove skupine koji je najrasprostranjeniji u eteričnim uljima (slika 10.).^{10,12}



Slika 10. Struktura eugenola¹⁰

1.2.3. Ostali spojevi eteričnih ulja

Sastav eteričnog ulja je kompleksan i razlikuje se od biljke do biljke. Pod ostalim spojevima koji ulaze u sastav eteričnih ulja najčešće se podrazumijevaju ravnolančani ugljikovodici (*n*-heptan) i njihovi derivati s kisikom. Postoje i spojevi s dušikom i sumporom, no oni su ograničeni na mali broj ulja. Odabrani primjeri ostalih spojeva eteričnih ulja su indol i β -damascenon (slika 11.).^{10,13}



Slika 11. Strukture indola i β -damascenona¹⁰

1.4. Izolacija eteričnih ulja vodenom destilacijom

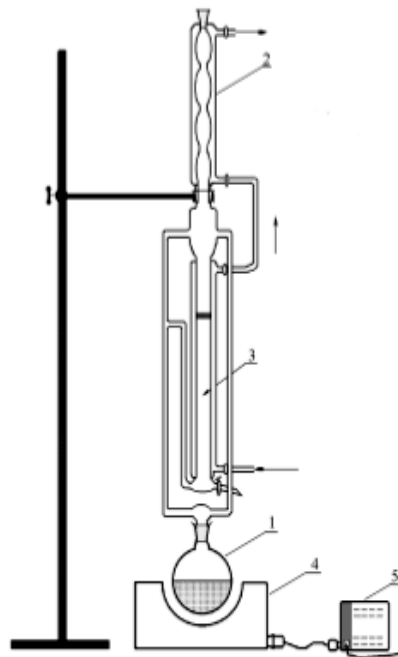
Destilacija (engl. *distillation*) je najčešća metoda izolacije hlapljivih spojeva. Uzorak, u ovom slučaju biljni materijal, podvrgnut je zagrijavanju pri čemu se hlapljivi spojevi prevode u paru koja se odvodi i hlađenjem kondenzira.

Vodena destilacija koristi se za izolaciju tvari visokog vrelišta (iznad 200 °C) koje bi se termički razgradile jednostavnom destilacijom jer su pri visokoj temperaturi nepostojane (npr. eterična ulja). Specifičnost ovakve vrste destilacije je neposredni kontakt vode i biljnog materijala. Većina eteričnih ulja ima visoku temperaturu vrelišta (između 150 i 200 °C). Ako bi zagrijavali biljni materijal do takvih temperatura, u njima bi počeo proces oksidacije te bi zbog toplinske razgradnje došlo do nastajanja raznih artefakata. Artefakti su spojevi koji nisu prisutni u izvornom biljnom uzorku, već su nastali dekompozicijom ili reakcijom individualnih isparljivih spojeva tijekom izolacije. Srećom, Daltonov zakon parcijalnih tlakova kaže da organske tvari, koje se ne miješaju s vodom, imaju svojstvo isparavanja zajedno s vodenom parom pri temperaturi koja je niža od njihova vrelišta, odnosno tlak para iznad heterogene smjese (smjesa dviju tekućina koje se ne miješaju) jednak je zbroju parcijalnih tlakova obje komponenti za danu temperaturu: $p = p_A + p_B$.

Kondenzirana voda zajedno sa djelomično otopljenim ili emulgiranim komponentama eteričnog ulja se naziva hidrolat ili cvjetna vodica i ona je vodena otopina zasićena spojevima eteričnog ulja, a koristi se kao mirisni proizvod osobito u kozmetici. Njen kemijski sastav obiluje hidrofilnijim spojevima (kislinae, alkoholi, aldehidi) za razliku od samog eteričnog ulja koje sadrži veliku količinu monoterpena i seskviterpena koji su hidrofobni. S obzirom da se eterično ulje ne otapa u vodi, dobiveni

destilat sadrži odvojene slojeve: na površini se skupljaju eterična ulja, a voda ispod njih jer su u većini slučajeva eterična ulja lakša od vode.

Vodena destilacija ima niz prednosti u odnosu na ostale metode izolacije isparljivih spojeva (npr. ekstrakciju), budući destilat ne sadrži neisparljive tvari koje mogu interferirati. Međutim, mogućnost nastajanja artefakata zbog toplinske razgradnje i hidrolize spojeva zbog velike količine otapala (vode) te mala iskorištenja eteričnog ulja su najveći nedostaci vodene destilacije.^{14,15}



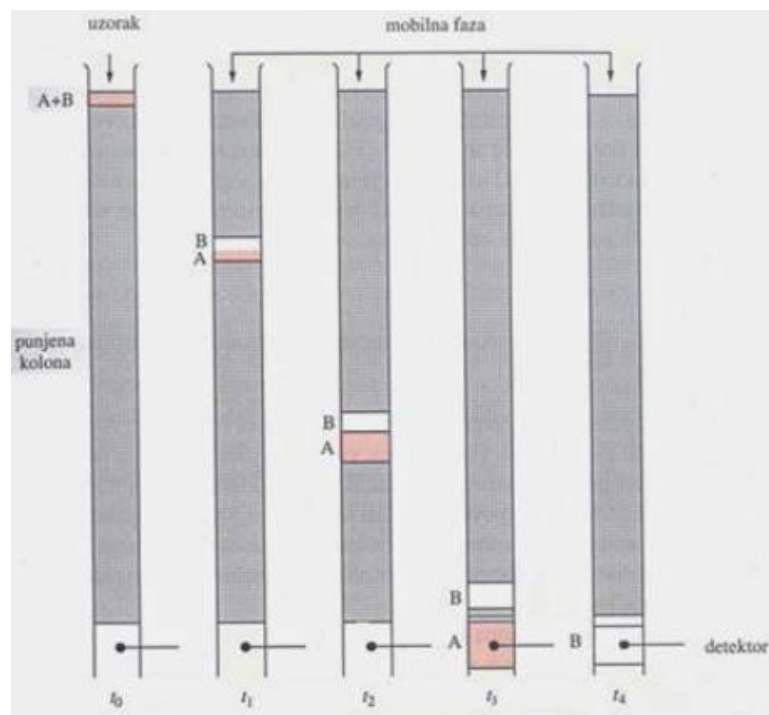
Slika 12. Shema aparature po Clevengeru (1-tikvica s okruglim dnom, 2-vodeno hladilo, 3-središnji dio aparature, 4-kalota, 5-otpornik promjenjivog otpora)¹⁴

1.5. Kemijska analiza eteričnih ulja

Mnoga eterična ulja su složene smjese velikog broja spojeva koji imaju slična fizikalno-kemijska svojstva. Najčešće se radi o monoterpenima i seskviterpenima slične ili iste molekulske formule. Takvi spojevi imaju iste ili različite funkcijske skupine. Upravo zbog toga kemijska analiza spojeva eteričnih ulja može predstavljati ozbiljan problem organske analize. Hlapljivi spojevi se analiziraju identifikacijom pojedinih spojeva unutar smjese (kvalitativna analiza) i određivanjem udjela tih spojeva u smjesi (kvantitativna analiza). Instrumentalna tehnika za analizu eteričnih ulja, ali i ostalih smjesa hlapljivih spojeva je vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa ili kraće GC-MS sustav (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).¹⁵

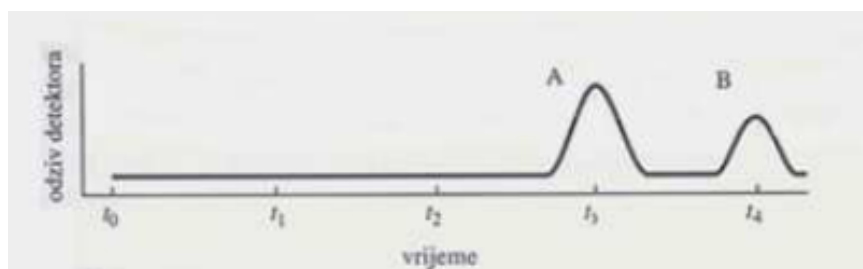
1.5.1. Kromatografske metode

Kromatografija (engl. *chromatography*) je fizikalna metoda kojom se odjeljuju sastojci smjese ovisno o njihovoj raspodjeli između dviju faza od kojih je jedna nepokretna ili stacionarna s velikom površinom, a druga je pokretna ili mobilna koja se kreće kroz stacionarnu fazu u određenom smjeru. Omogućuje odjeljivanje i identifikaciju složenih smjesa organskih spojeva poput eteričnih ulja. Stacionarna faza može biti krutina ili kapljevina, a mobilna kapljevina ili plin. Navedena metoda se temelji na uspostavljanju dinamičke ravnoteže nekog spoja između stacionarne i mobilne faze, a gibanje mobilne faze uzrokuje narušavanje ravnoteže pa spojevi putuju u smjeru gibanja mobilne faze. Različiti spojevi putuju različitim brzinama zbog razlika između koeficijenta raspodjele i na taj način se odjeljuju (slika 13.).



Slika 13. Razdvajanje komponenti A i B u koloni¹⁶

U vremenu t_1 - t_4 postiže se razdvajanje komponenta koje je posljedica stalnog dodavanja mobilne faze koja ispire uzorak. U ovom slučaju komponenta A brže putuje kroz kolonu jer komponenta B ima veći afinitet za stacionarnu fazu pa se dulje na njoj zadržava. Komponenta A će prije doći do detektora (t_3) od komponente B (t_4) kao što je prikazano na kromatogramu (slika 14.) koji predstavlja grafički prikaz odziva detektora, to jest signala u ovisnosti o vremenu. Položaj pika daje kvalitativnu, a površina pika kvantitativnu analizu.



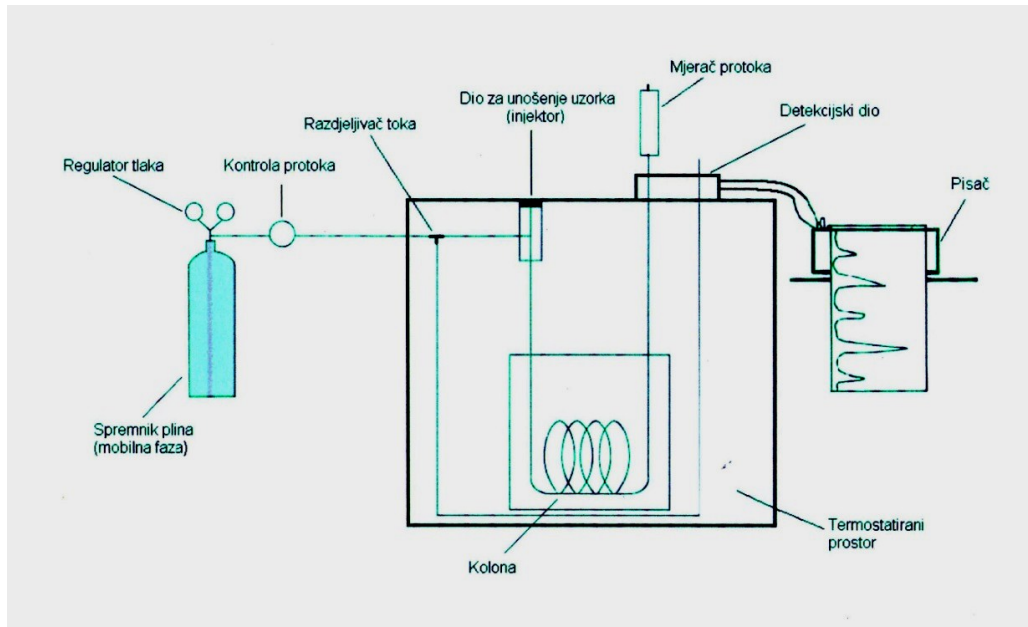
Slika 14. Grafički prikaz odjeljivanja komponenti A i B kromatografijom (S – signal, t – vrijeme zadržavanja)¹⁶

1.5.1.1.1. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je suvremena i najčešće korištena tehnika odjeljivanja smjese hlapljivih spojeva, pa tako i eteričnih ulja. Služi za kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenata analiziranog uzorka u kojoj se kao mobilna faza koristi inertni plin nositelj, a najčešće su to helij i dušik, a uz nužne mjere opreza i vodik.¹¹

Nepokretna faza je selektivna tekućina velike viskoznosti ili selektivna krutina, a može biti polarna i nepolarna. Eterična ulja sastoje se od terpena i njihovih derivata koji imaju slične temperature vrenja, eluiraju se u vrlo uskom rasponu na nepolarnim kolonama. Da bi se nadvladalo ovo ograničenje, analitička metoda se modificira primjenom sporijeg rasta temperature u pećnici, kako bi se proširio elucijski opseg komponenata ulja. Obzirom da je pokretna faza plin, pri analizi komponente smjese se moraju prevesti u plinsku fazu i to je jedan od glavnih uvjeta da bi se plinskom kromatografijom tvar mogla analizirati. S obzirom da su spojevi u eteričnim uljima hlapljivi, plinska kromatografija idealan je način analize takve smjese. Uzorci moraju biti hlapljivi kako bi trenutno isparili u injektoru i bili stabilni pri temperaturi na koju se zagrijava kromatografska kolona. Injektor je dio plinskog kromatografa koji se nalazi na početku kromatografa, a služi za isparavanje analiziranog uzorka i njegovo miješanje s plinom nosiocem koji nosi komponente na kolonu. Nakon što se uzorak unese mikrolitarskom štrcaljkom u injektor, odmah dolazi do potpunog isparavanja te miješanja s plinom nositeljem koji "nosi" molekule uzorka duž kolone. Osim plina nositelja i injektora, plinski kromatograf (slika 16.) još sadrži regulator tlaka i mjerač protoka, kromatografsku kolonu sa nepokretnom fazom u termostatom prostoru, pojačalo, detektor i računalo. Kromatografska kolona je dugačka kapilara različitih dimenzija kojoj je na stijenci ili na ispuni od krutog nosača nanesen sloj nepokretne faze. Detektor plinskog kromatografa je uređaj koji temeljem fizikalnih ili kemijskih promjena može registrirati prisutnost eluirane komponente te se može zaključiti da je pravilan izbor detektora od velikog značaja. On daje signal za svaku komponentu ovisno njenoj o masi ili koncentraciji. Pojedinačne komponente smjese se pojavljuju na kromatografu u vidu zasebnih pikova. Karakterističan podatak za svaku komponentu je njeno vrijeme zadržavanja koje se mjeri od trenutka injektiranja uzorka pa sve do pojave maksimuma pika te komponente u uzorku na kromatografu. Poseban problem tijekom analize predstavlja djelomično ili potpuno preklapanje pikova. Vrijeme

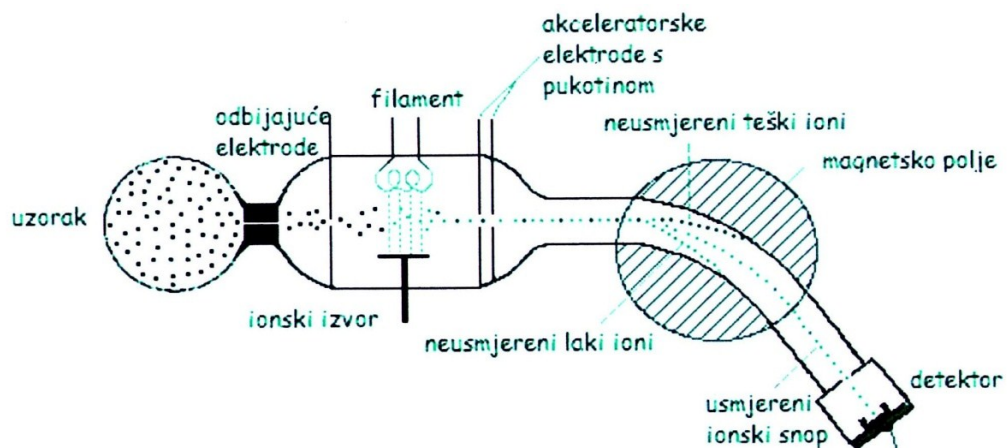
zadržavanja može poslužiti kao veličina za kvalitativno određivanje, ali ovo nije pouzdan način pa se nikako ne smije koristiti za određivanje sastava nepoznatih i ranije neidentificiranih spojeva.^{11,17,18}



Slika 15. Shematski prikaz plinske kromatografije¹⁴

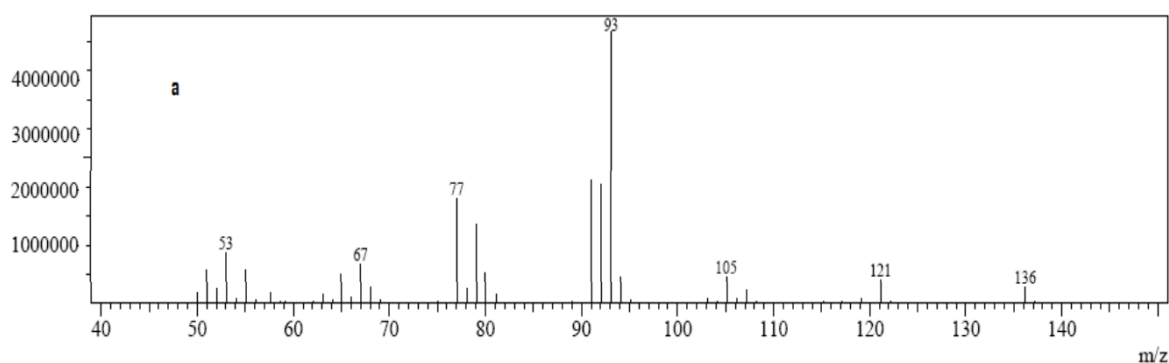
1.5.2. Spektrometrija masa (MS)

Spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*) se najčešće koristi kao detektor u plinskoj kromatografiji i jedan je od najpouzdanijih detektora. On koristi visokoenergetske elektrone kako bi razbio molekulu na fragmente koji daju informacije o molekulskoj masi i strukturi spoja.



Slika 16. Princip rada spektrometra masa¹⁷

Komponente nakon razdvajanja na koloni ulaze u ionizator koji je u visokom vakuumu. Molekule uzorka bombardiraju se snopom elektrona visoke energije (~70 eV) što dovodi do izbacivanja jednog elektrona iz molekule i nastajanja molekulskog iona $[M]^+$ s velikim suviškom energije. Preostala energija uzrokuje cijepanje molekulskog iona te tako nastaju kationski fragmenti koji se zajedno s molekulskim ionom ubrzavaju pomoću negativno nabijenih elektroda te se formiraju u snop. Pri prolasku kroz magnetsko polje i oni dobivaju otklon razmjernan njihovoj brzini, masi i naboju. Veličina otklona obrnuto je proporcionalna masi fragmenta. Ioni zatim ulaze u detektor gdje dobivaju signal i potom se određuju putem spektra masa, odnosno grafičkog prikaza funkcije omjera mase i naboja, m/z (slika 17.). Spektrometrija masa je izrazito korisna kada se u uzorku nađu pojedine molekule za koje nema standarda ili kada analiziramo nepoznati uzorak kojem ne znamo sastav (kvalitativna analiza).^{11,17}



Slika 17. Spektar masa α -pinena ($M_r = 136$)¹⁸

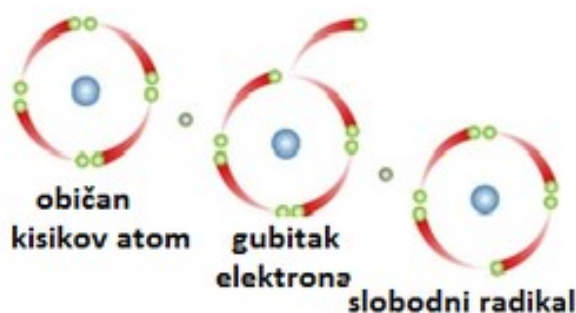
Spektar masa α -pinena sadrži niz okomitih pravaca gdje svaki od njih predstavlja ion sa specifičnim omjerom mase i naboja. Duljina pravca označava relativni intenzitet iona. Najduži pravac prikazuje najintenzivniji signala, a naziva se osnovnim ionom te predstavlja standard prema kojem se mjere ostali ioni. Na slici 18. osnovni ion je na $m/z = 93$. Prema dogovoru je uzeto da je relativni intenzitet osnovnog pika 100. Ion s najvećom vrijednosti m/z vrlo vjerojatno je molekulski ion (kod pojedinih spojeva molekulski ioni mogu izostati sa spektra masa) i on odgovara relativnoj molekulskoj masi ispitivanog spoja. Na primjeru α -pinena se vidi da njegov molekulski ion odgovara njegovoj molekulskoj masi 136.¹⁷

1.5.3. Vezani sustav GC-MS

Plinska kromatografija i spektrometrija masa se vrlo dobro nadopunjuju u identifikaciji sastojaka koji se nalaze u smjesi hlapljivih spojeva i izuzetno su osjetljive tehnike. Naime, obje rade s uzorkom u plinskoj fazi tako spojevi koji su odvojeni plinskom kromatografijom mogu jednostavno biti analizirani spektrometrijom masa. Zapravo spektrometrija masa nadopunjava pouzdanu kvalitativnu analizu koja nedostaje plinskoj kromatografiji Vezani sustav GC-MS široko se primjenjuje u prehrambenoj industriji, pogotovo kod identifikacije spojeva zaslužnih za aromu hrane ili pića te kod identifikacije pojedinih onečišćenja vode.¹⁹

1.6. Slobodni radikali i oksidacijski stres

Pod nazivom slobodni radikal podrazumijeva se svaka kemijska vrsta, atom, molekula ili dio molekule, koja u vanjskoj ljusci ima jedan ili više nesparenih elektrona (slika 18.). To je nestabilna čestica koja je, zbog težnje da popuni valentnu orbitalu, vrlo reaktivna. Reakcije radikala uglavnom su lančane jer reakcije jednog radikala potiču stvaranje drugog, odnosno nestabilni radikali reagiraju sa stabilnim molekulama i uzimaju im elektron pa tad one postanu nestabilne. Radikal ima sposobnost oksidirati biološke molekule kao što su: lipidi, proteini i DNA. Smatra se da na taj način dolazi do razvoja karcinoma i stalih kroničnih bolesti.^{20,21}



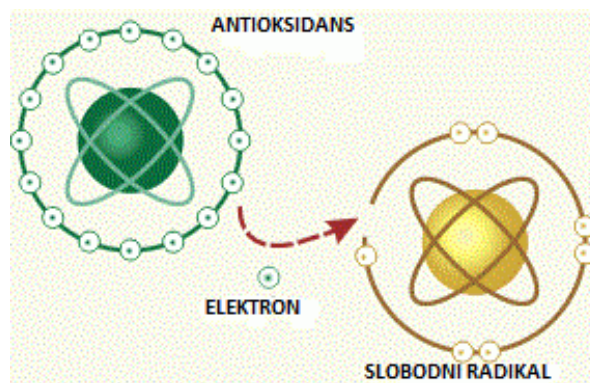
Slika 18. Nastanak slobodnog radikala²²

Oksidacijski stres definiran je kao stanje pretjeranog stvaranja slobodnih radikala, pri čemu dolazi do narušavanja ravnoteže između stvaranja radikala i

mogućnosti stanice da ih razgradi te na taj način dolazi do promjena koje prate oštećenje stanica. U takvim okolnostima ravnoteža je pomaknuta prema prekomjernom stvaranju radikala (oksidaciji) koja nastaje ukoliko je smanjena antioksidacijska zaštita organizma. Smatra se da je oksidacijski stres jedan od glavnih uzročnika nastanka raznih bolesti kardiovaskularnog, imunološkog, probavnog i središnjeg živčanog sustava (Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest).^{23,24}

1.7. Antioksidansi i antioksidacijsko djelovanje

Antioksidansi (engl. *antioxidants*) su kemijski vrlo važna i raznovrsna skupina spojeva koji prisutni u niskim koncentracijama usporavaju, odgađaju ili sprječavaju oksidaciju na način da doniraju elektron slobodnim radikalima čime ih stabiliziraju (slika 19.). Mogu nastati u metaboličkim procesima u stanici (endogeni) ili se mogu unositi u organizam putem ishrane (egzogeni).^{23,25}



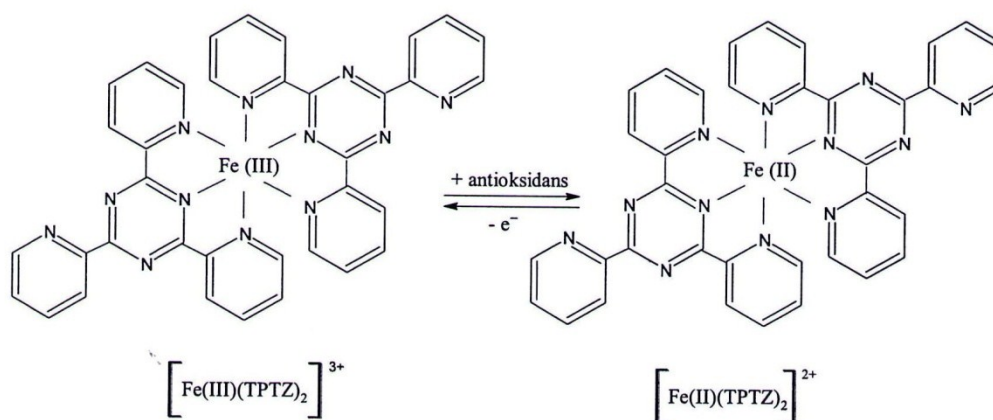
Slika 19. Djelovanje antioksidansa na slobodni radikal¹⁰

Djelovanje antioksidansa onemogućava stvaranje novih slobodnih radikala, neutralizira već stvorene radikale ili popravljaju oštećenja nastala djelovanjem radikala. Antioksidansi mogu biti prirodni (askorbinska kiselina, tokoferol, karotenoidi, flavonoidi) i sintetski (butil-hidroksianisol, butil-hidroksitoluen, propil-galat).²⁶

1.7.1. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava

1.7.1.1. FRAP metoda

FRAP metoda (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) je jedna od najčešće korištenih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. To je jednostavan i direktan test za određivanje redukcijske sposobnosti antioksidansa. Temelji se na prijenosu elektrona (engl. *Electron Transfer*, ET) kojom se mjeri sposobnost redukcije. Žuto obojeni kompleks soli željeza Fe(III) (TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ; 2,4,6-tripiridil-*s*-triazin) koristi se kao oksidans koji se niskom pH reducira u Fe^{II}-TPTZ oblik pri čemu dolazi do pojave intenzivno plave boje što se detektira pri valnoj duljini od 593 nm nakon 4 minute od dodatka antioksidansa u reakcijsku smjesu (slika 20.).^{26,28}

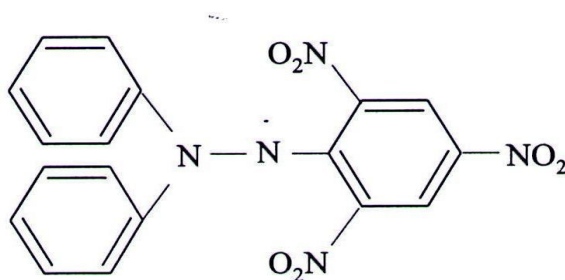


Slika 20. FRAP reakcija³¹

Prednosti FRAP metode su: niska cijena analize, jednostavna priprema FRAP reagensa, brza analiza, ne zahtijeva posebnu opremu. Međutim, problem je što ne detektira antioksidanse koji djeluju preko HAT mehanizma (engl. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT) gašenja molekula radikala (metode temeljene na prijenosu atoma vodika), npr. proteine i tirole. Također, redukcijska aktivnost nekih antioksidansa nije završena nakon 4 minute pa konačni rezultati dosta ovisi o vremenu reakcije.^{26,27}

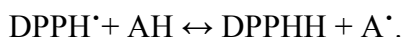
1.7.1.2. DPPH metoda

DPPH metoda pripada HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer, HAT*) skupini metoda koje se temelje na prijenosu atoma vodika, odnosno *gašenju* slobodnih radikala. Ova brza i jednostavna metoda koristi relativno stabilni dušikov radikal, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]), koji sadrži jedan nespareni elektron na jednom atomu dušikova mosta (slika 21.).



Slika 21. Struktura DPPH radikala³¹

Mehanizam DPPH reakcije temelji se na doniranju atoma vodika radikalima koji se reducira pri čemu nastaje DPPHH i radikal antioksidansa A[•]:



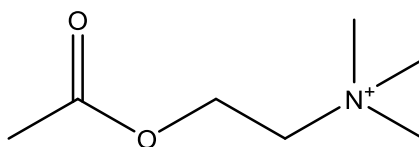
DPPH je tamnoljubičaste boje, a dodatkom antioksidansa ili bilo kojeg spoja koji ima slabu X-H vezu, otopina blijedi i prelazi u žutu boju jer se slobodni radikal reducira u difenilpikrilhidrazilin. Ne ovisi o polarnosti antioksidansa već samo o njegovoj strukturi. Napredovanje reakcije prati se spektrofotometrom pri valnoj duljini od 517 nm, a kao konačna točka nakon mjerenja uzima se vrijednost izmjerena nakon 60 minuta. Budući DPPH radikal apsorbira kod valne duljine od 517 nm, njegovom pretvorbom u neradikalni oblik, uslijed reakcije s antioksidansom, dolazi do smanjenja apsorbancije. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije računa se postotak redukcije DPPH radikala.^{26,29}

Ova metoda je jednostavna i brza, rezultati su ponovljivi, ne zahtijeva velike količine uzorka, a za mjerenje je potreban samo UV-VIS spektrofotometar. Međutim, nedostatak je što je DPPH radikal topljiv samo u organskim otapalima (pogotovo u alkoholu), dok u vodi nije. Također, na rezultate mjerenja utjecaj mogu imati svjetlo, kisik i druge vrste otapala.²⁹

1.8. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze

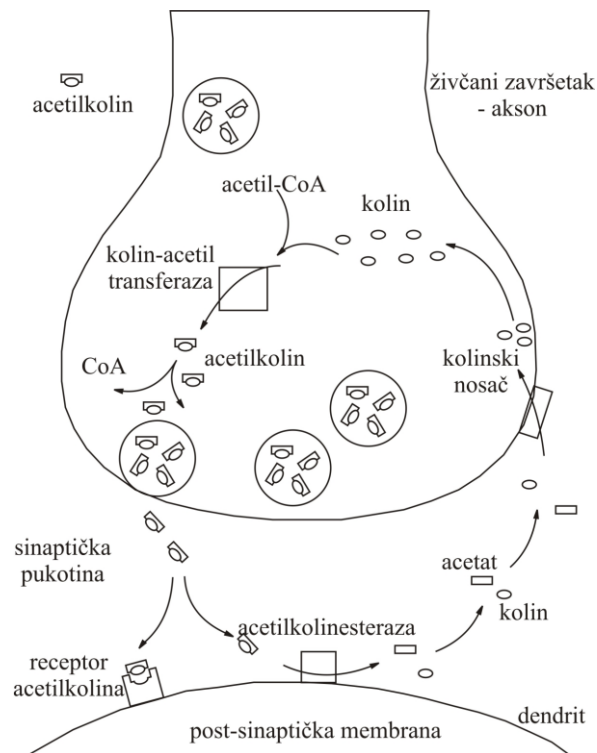
1.8.1. Acetilolin i acetilkolinesteraza

Acetilolin (engl. *Acetylcholine*, ACh), acetilni ester kolina, je neuroprijenosnik koji se izlučuje u autonomnom živčanom sustavu, u neuromišićnoj spojnici i brojnim sinapsama središnjeg živčanog sustava. Ima važnu ulogu u održavanju stanja svijesti te u procesima učenja i pamćenja. Sintetizira se iz kolina i acetil-koenzima A uz djelovanje enzima kolin-acetil transferaze. Njegova struktura prikazana je na slici 22.



Slika 22. Struktura acetilkolina³¹

Acetilolin djeluje tako da pobuđuje prijenos signala među neuronima kao i do stanica mišića. Nalazi se u vrećicama na krajevima neurona iz kojih se depolarizacijom živčanog kraja otpušta u sinaptičku pukotinu, a potom se veže na odgovarajući receptor. Na sinapsama se izlučeni ACh veže na receptor postsinaptičke stanice gdje izaziva novi akcijski potencijal, odnosno pokreće se niz procesa koji rezultiraju depolarizacijom membrane i daljnim prijenosom živčanog impulsa. Ubrzo nakon izlučivanja, ACh se djelovanjem acetilkolinesteraze hidrolizira na kolin i acetat, ponovno se uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane i prijenos impulsa prestaje (slika 23).³¹



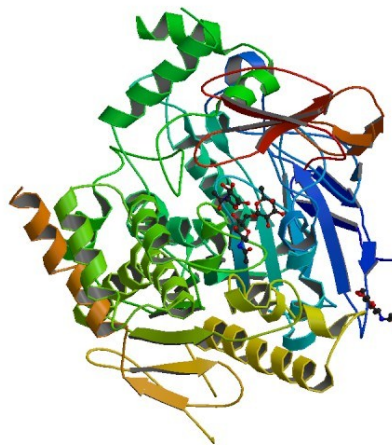
Slika 23. Prikaz kružnog ciklusa acetilkolina³¹

Acetilkolinesteraza (engl. *Acetylcholinesterase*, AChE) je enzim iz klase hidrolaza (skupine hidrolaza karboksilnih kiselina) čija je uloga hidroliza acetilkolina na acetat i kolin koji se vraća u presinapsni živčani završetak za ponovnu proizvodnju acetilkolina:



Na taj način se omogućava i kontrolira normalan i nesmetan prijenos signala u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama jer kad bi hidroliza acetilkolina bila inhibirana, došlo bi do njegova nakupljanja na postsinaptičkoj membrani čime bi se spriječio prolazak idućeg živčanog impulsa. Prema brzini hidrolize acetilkolina, AChE je jedan od učinkovitijih enzima u prirodi. Acetilkolinesteraza se nalazi i u krvi gdje je vezana za eritrocite, ali njezina uloga tu još nije objašnjena. S obzirom da je riječ o složenom proteinu, poznavanje strukture AChE temelji se na istraživanjima strukture enzima električne jegulje budući da su im strukture vrlo slične pa se većina *in vitro* istraživanja odvija na tom enzimu kao modelu.

Inhibitori AChE koriste se u tretmanu Alzheimerove bolesti i pokazali su se kao najuspješniji pristup ublažavanja simptoma. Inače, kod pacijenata oboljelih od ovog oblika demencije dolazi do sniženja enzima potrebnih za razgradnju i sintezu acetilkolina za 30 %. Također, autopsija pacijenata koji su imali ovu bolest pokazuje oštećenja tzv. bazalne jezgre koja se nalazi u moždanom deblu i proizvodi acetilkolin. Takrin, donepezil, rivastigmin i galantamin su inhibitori AChE koji su odobreni za kliničku upotrebu kod tretiranja Alzheimerove bolesti.^{31,32}



Slika 24. Trodimenzijska struktura enzima acetilkolinesteraze, pdb=1b41 (Protein Data Bank)³³

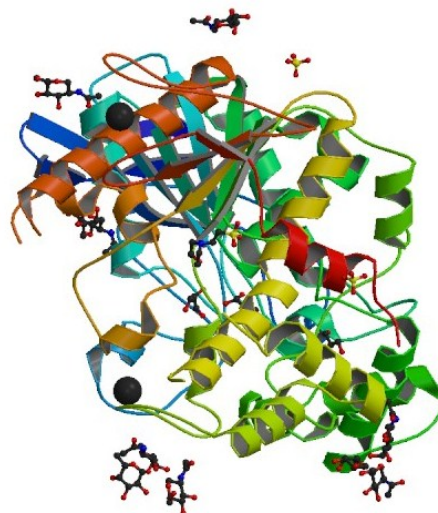
1.9. Sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze

1.9.2. Butirilkolin i butirilkolinesteraza

Butirilkolinesteraza (engl. *Butyrylcholinesterase*, BChE) je enzim koji pripada skupini kolinesteraza, a sintetizira se u jetri i nakon toga se izlučuje u krv. Ovaj enzim hidrolizira estere na kiseline i alkohol. Aktivnost enzima dokazana je i u drugim tkivima, poput masnog tkiva, tankog crijeva, pluća i bijele tvari mozga. AChE i BChE se razlikuju prema vrstama spojeva koje hidroliziraju. BChE je manje selektivna prema veličini i prirodi acilne skupine estera koja se hidrolizira. Dobro hidrolizira butirilkolin i benzoilkolin.³⁴

Fiziološka uloga BChE još uvijek nije dobro istražena. Nije esencijalna za prijenos živčanih impulsa, ali pretpostavlja se da je njena uloga važna tijekom nastajanja živčanog sustava te da je uključena u metabolizam lipida i lipoproteina, diferencijaciji i rastu živčanih stanica i regulaciji količine acetilkolina u glatkim mišićima. Aktivnost BChE smanjena je kod bolesnika s malignim tumorima želuca, debelog crijeva i prostate.³⁵

Danas je poznato da su BChE i AChE povezane s progresijom Alzheimerove bolesti jer su ciljno mjesto djelovanja lijekova koji inhibiraju njihovu katalitičku aktivnost. Djelovanje BChE progresivno se povećava s vremenom kod pacijenata s Alzheimerovom bolesti, a aktivnost AChE ostaje nepromijenjena ili se smanjuje. Kao i AChE, BChE inaktivira neuroprijenosnik acetilkolin i kao takva postala je terapijski cilj u Alzheimerovoj bolesti.³⁴



Slika 25. Trodimenzijska struktura enzima butirilkinolinesteraze, pdb=1p0i (Protein Data Bank)³⁶

1.10. Antimikrobna aktivnost

1.10.1. Antimikrobni potencijal eteričnih ulja

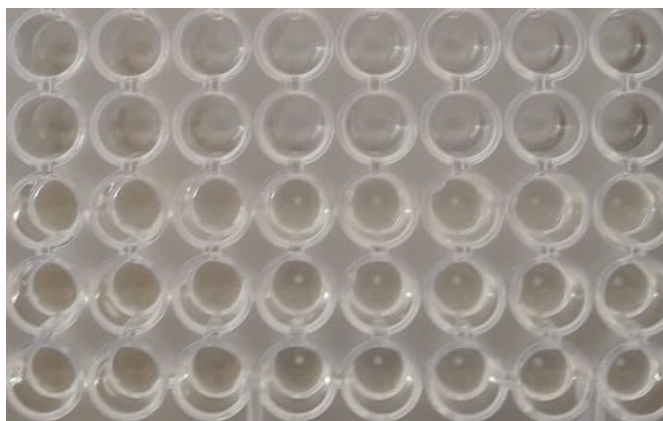
Biljke proizvode razne spojeve za obranu od patogenih mikroorganizama koji su nastajali i bili zaštićeni te skladišteni u njihovim stanicama tijekom stotina milijuna godina evolucijskog napretka. U njima su se sačuvali pojedini spojevi koji su bili najaktivniji protiv mikroorganizama koji nisu uspjeli razviti rezistenciju. Antimikrobna svojstva eteričnih ulja prepoznata su od davnina te su se upotrebljavala kao prirodna sredstva u farmaciji, fitopatologiji, medicini, kliničkoj mikrobiologiji te za konzerviranje hrane. Razlog zbog kojeg bakterije nisu uspjele razviti rezistenciju na eterična ulja leži u činjenici da su eterična ulja smjese tvari različitih mehanizama djelovanja, za razliku od antibiotika, gdje se radi samo o jednoj aktivnoj tvari protiv kojih bakterija treba razviti rezistenciju. Veliki broj istraživanja je izvijestio da antimikrobni učinak eteričnog ulja ovisi o kemijskom sastavu na kojeg utječe izloženost temperaturi, svjetlosti i zemljopisno porijeklo biljke.

Važno svojstvo eteričnih ulja je njihova hidrofobnost, što im omogućuje interakciju s lipidima bakterijskih membrana i mitohondrija, mijenjajući njihovu strukturu i permeabilnost. Snižanjem pH vrijednosti povećava se hidrofobnost eteričnih ulja što im omogućuje lakše otapanje u lipidima i prolaz kroz lipidnu membranu bakterije. Općenito, eterična ulja s izrazitom antimikrobnom aktivnosti sadrže visok postotak fenolnih spojeva.^{37,38}

1.10.2. Dilucijske metode

Dilucijskim metodama određuje se minimalna inhibitorna koncentracija, a to je najniža koncentracija antibiotika koja sprječava rast bakterija. Može se izvoditi na tekućoj ili čvrstoj podlozi, tako da se antibiotik serijski razrjeđuje, inkorporira u bakteriološku podlogu i zatim se u nju, ili na nju, inokulira ispitivani soj bakterije. Nakon inkubacije od 18 do 24 sata na 35 - 37 °C, gleda se prisutnost zamućenja (bujona) ili porast kolonija (na čvrstoj) podlozi. Koncentracija antibiotika, koja se nalazi u prvoj podlozi (u nizu), u kojoj nema porasta bakterija, naziva se minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i izražava se mg L^{-1} ili $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dilucijska metoda se može izvoditi kao mikrodilucija, ako se izvodi u mikrotitarskim pločicama ili kao makrodilucija, ako se izvodi u nizu epruveta. Danas se uglavnom primjenjuje mikrodilucijska metoda, jer je

jednostavnija za izvođenje i jeftinija jer je manji utrošak podloga. Jažice u kojima je bujon ostao bistar, sadržavaju dovoljno visoku koncentraciju uzorka potrebnu za inhibiciju rasta, a oni u kojima se bujon zamutio, sadržavaju antibiotik u koncentraciji nižoj od MIK-a tako da su se bakterije umnožile (slika 26.).



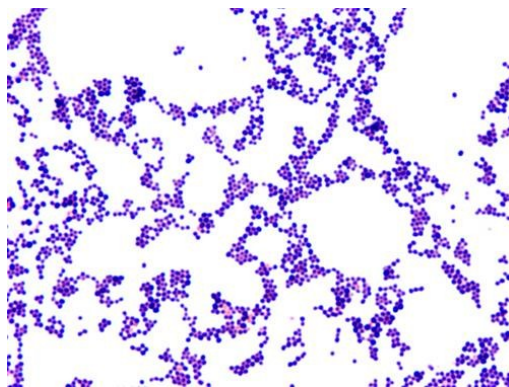
Slika 26. Mikrodilucijski test

Ako se u dilucijskoj metodi u bujonu, nakon inkubacije od 18 do 24 sata, podloge bez vidljivog porasta bakterija subkultiviraju na čvrstu podlogu bez antibiotika, može se odrediti i minimalna baktericidna koncentracija (MBK), najniža koncentracija uzorka koja ubija određenu bakteriju, a izražava se također u mg L^{-1} ili $\mu\text{g mL}^{-1}$. MBK je u pravilu veća od MIK vrijednosti do 32 puta (ako je omjer MIK/MBK veći od 32, govori se o toleranciji bakterije na antibiotik).^{39,40}

1.10.3. Korišteni sojevi mikroorganizama

Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja ispitana je na ukupno 11 vrsta oportunističkih patogenih mikroorganizama, među kojima 8 vrsta Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* i *Streptococcus pneumoniae*.

S. aureus je gram pozitivna bakterija koja može biti dio normalne flore kože i nosa, ali je jedan od najvažnijih ljudskih patogena. Može biti uzročnikom raznih infekcija, a najčešće kože, mekih tkiva, kosti i krvi.



Slika 27. *Staphylococcus aureus*⁴¹

S. pyogenes, poznat i kao beta-hemolitički streptokok skupine A, je bakterija koja živi na sluznici gornjih dišnih puteva ljudi. Najčešći je bakterijski uzročnik akutne upale ždrijela, a može uzrokovati i akutnu upalu srednjeg uha, upalu pluća, infekcije kože i mekih tkiva, infekcije kardiovaskularnog, mišićno-koštanog, limfnog sustava, meningitis i druge bolesti.

Vrste roda *Enterococcus* izazivaju urinarne infekcije, a posljednjih godina vrste ovog roda postale su jedne od vodećih uzročnika intrahospitalnih infekcija te su takvi sojevi izuzetno rezistentni na antibiotike.

Spore *B. cereus* vrlo lako kontaminiraju hranu i ako imaju povoljne uvjete, vrlo brzo se namnože u velikome broju i mogu izazvati bolest. Spore se mogu inaktivirati na temperaturi od 100 °C za četiri minute, a aktivni (vegetativni) oblici bakterija za minutu na temperaturi od 60 °C. *B. cereus* značajan je uzročnik trovanja hranom u mnogim zemljama.

Klostridiji, a najviše *C. perfringens*, česti su uzročnici miješanih abdominalnih infekcijama koje nastaju nakon rupture unutarnjih organa ili zbog upalne bolesti zdjelice. *Clostridium* sp. su česti stanovnici probavnog trakta i nalaze se kod mnogih trbušnih infekcija, uglavnom pomiješani s drugim crijevnim mikroorganizmima.

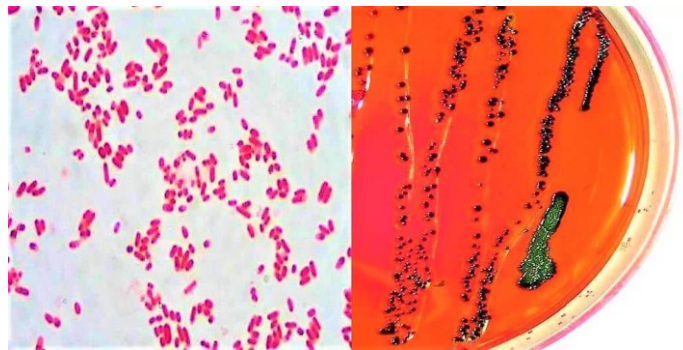
L. monocytogenes je novi patogen u mikrobiologiji namirnica, a prisutna svugdje u prirodi te može biti prisutna i u kuhanoj hrani kao rezultat naknadne kontaminacije prljavim priborom i posuđem. Listerioza je bolest uzrokovana bakterijom *L. monocytogenes* i ima vrlo blage simptome nalik gripi. Međutim, infekcija ovom

bakterijom je izuzetno opasna za malu djecu, trudnice te starije osobe sa slabijim imunitetom. S obzirom da je još uvijek nepoznata infekcijska doza ove bakterije, mikrobiološki standard za ovu bakteriju je vrlo strog; bakterija uopće ne smije biti prisutna u hrani.

M. luteus je gram-pozitivna bakterija koja je zbog široke rasprostranjenosti često prisutna u namirnicama. Prisutna je na koži čovjeka i dio je normalne flore. Nije patogena za čovjeka, iako kod osoba sa oslabljenim imunitetom može izazvati infekcije.

Gram pozitivna bakterija *S. pneumoniae* je vodeći uzrok upale pluća diljem svijeta te je među glavnim uzročnicima smrti djece ispod 5 godina starosti. Ostale bolesti koje ova bakterija uzrokuje obuhvaćaju uobičajene infekcije, poput upale srednjeg uha, ali i meningitisa (invazivne bolesti visoke stope smrtnosti).

Ispitivana je i *Escherichia coli* kao predstavnik Gram-negativnih bakterija. Pripada skupini *Enterobacteriaceae* te se često koristi kao model organizam za bakterije općenito. Ova bakterija je dio normalne crijevne flore ljudi i životinja. Ipak, najčešći je uzročnik infekcija mokraćnog trakta, uključujući i infekciju bubrega.



Slika 28. *Escherichia coli*⁴²

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja testirano je na kvasnici *Candida albicans* te plijesni *Aspergillus niger*.

C. albicans je patogena gljivica, uzročnik infekcija kandidijaza, koje imaju visoke stope morbiditeta i mortaliteta. Nalazi se normalno u ustima, probavnom traktu i rodnici, ali njeno umnožavanje dovodi do upale koja može uzrokovati promjenu

normalne flore. Zbog toga je posebno opasno kada se kandidijaza pojavi nakon prethodne uporabe antibiotika.



Slika 29. *Candida albicans*⁴³

Većina vrsta roda *Aspergillus* odlikuje se brzim rastom kolonija, a boja kolonija ovisi o vrsti. *A. niger* je jedna od najčešćih vrsta ovog roda i uzrokuje problem crne plijesni. Crna plijesan je posebno problematična jer uzrokuje više zdravstvenih problema nego ostale plijesni, neki od problema koje uzrokuje su glavobolje i vrtoglavica, pa sve do teških problema sa disanjem koji mogu završiti i hospitalizacijom.⁴⁴

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Prikupljanje, sušenje i skladištenje biljnog materijala

Grančice čempresa i gluhača sakupljene su u Splitu na Marjanu u šumi Kašuni (Gauss–Krüger koordinate: $x = 5613158$, $y = 4819144$) na nadmorskoj visini od 5 metara, a grančice alepskog bora (Gauss–Krüger koordinate: $x = 4613608$, $y = 4819088$) na nadmorskoj visini od 19 metara. Sve tri vrste sakupljene su 8. veljače 2019. godine.



Slika 30. Prikupljanje biljnog materijala

Sušenje biljnog materijala odvijalo se u laboratoriju na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu na sobnoj temperaturi u sjeni. Identifikacija biljnog materijala je izvršena uz pomoć botaničara izv. prof. dr. sc. Mirka Ruščića, PMF-Split.



Slika 31. Sušenje biljnog materijala

Nakon sušenja, bilo je potrebno ručno odvajati iglice čempresa, gluhača i alepskog bora. Biljni materijal je skladišten pakiranjem u papirnate vrećice.

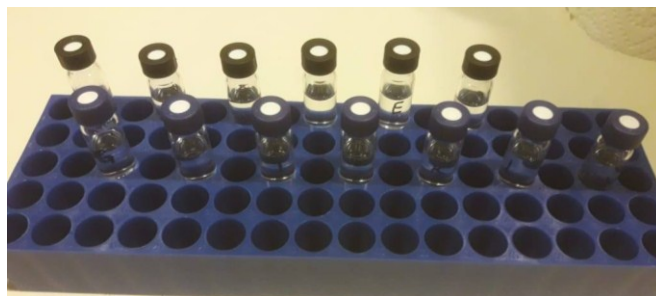
2.2. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom

Vodena destilacija iglica čempresa, gluhača i alepskog bora provedena je u aparaturi po Clevengeru (slika 32.). Igllice su stavljene u tikvicu s okruglim dnom te im je dodano destilirane vode u količini da prekrije biljni materijal u tikvici. U središnji dio aparature stavljeno je destilirane vode te smjesa sastavljena od 6 mL pentana i 2 mL dietil-etera ("trap" ili "klopka") koja služi za hvatanje eteričnog ulja i za smanjivanje eventualnog gubitka hlapljivih spojeva. Na aparaturu je postavljeno hladilo i uspostavljen je odgovarajući protok vode. Hlapljivi spojevi i voda su isparavali zajedno te su se kondenzirali u hladilu. Destilacija je trajala 3 sata nakon čega su se u središnjem dijelu aparature mogla uočiti dva sloja, gornji s eteričnim uljem i donji vodeni sloj. Za učinkovito odjeljivanje eteričnog ulja od vode, potrebno je pričekati da se destilat dovoljno ohladi da ne nastaje emulzija ulja s vodom. Pipetom je eterično ulje pažljivo odvojeno iz aparature.



Slika 32. Izolacija eteričnog ulja vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru

Nakon odvajanja ulja, ono i dalje sadrži manje ili više otopljene ili emulgirane vode, koja se uklanja bezvodnim Na₂SO₄. Za GC-MS analizu se uzme 200 µL uzorka i doda mu se 1 mL pentana. Ostatak uzorka se upari sa dušikom kako bi se uklonio višak otapala te mu se doda 5 mL etanola (za ostale metode). Uzorci su čuvani u hladnjaku u zatvorenoj bočici.



Slika 33. Uzorci eteričnih ulja pripremljeni za GC-MS analizu

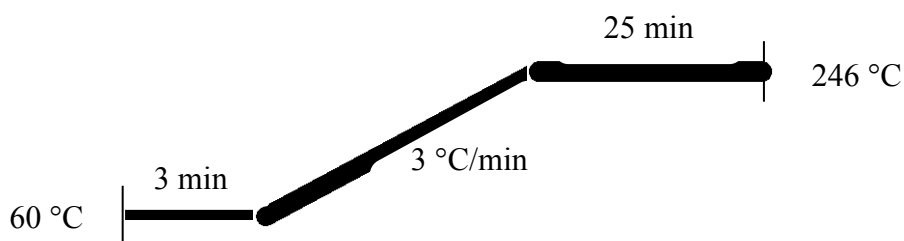
Iskorištenja eteričnih ulja čempresa, gluhača i alepskog bora prikazana su u tablici 4.

Tablica 4. Iskorištenja eteričnih ulja

Uzorak	Iskorištenja / %
<i>Cupressus sempervirens</i> L. (<i>horizontalis</i>)	0,1
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	0,14
<i>Pinus halepensis</i> Miller	0,09

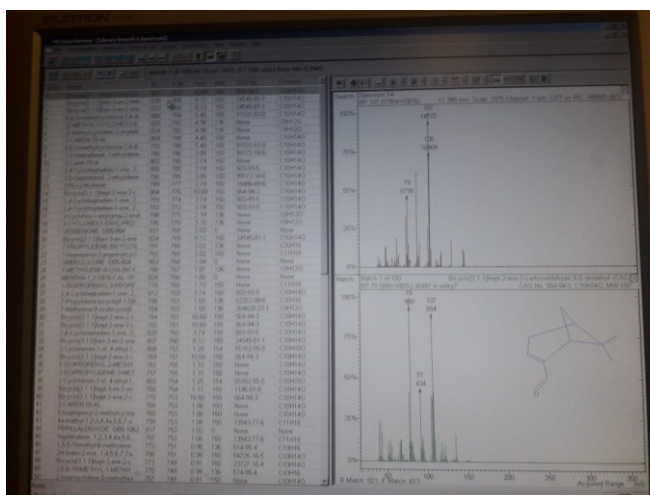
2.3. Kemijska analiza eteričnog ulja pomoću GC-MS

Kemijski sastav eteričnog ulja iglica čempresa, gluhača i alepskog bora analiziran je plinskim kromatografom (model 3900; Varian Inc., Lake Forest, CA, USA) koji je opremljen s plamenoionizacijskim detektorom (FID), spektrometrom masa (model 2100T; Varian Inc.) i nepolarnom kapilarnom kolonom VF-5MS (dužine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine stacionarne faze 0,25 μm). Uzorcima se dodaje 5 ml etanola prije GC-MS analize. Početna temperatura analize bila je 60 °C prve 3 minute, a nakon toga je rasla do 246 °C brzinom 3 °C min^{-1} (slika 34).



Slika 34. Program rasta temperature u grijanom dijelu GC-MS-a

Inertni plin nosilac je helij, brzina protoka je 1 mL min^{-1} , a ukupno trajanje mjerenja je 90 minuta. Identifikacija sastojaka je izvršena usporedbom njihovih vremena zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju *n*-alkana $\text{C}_8\text{-C}_{30}$ za kolonu VF-5MS) s vremenima zadržavanja iz baze podataka Zavoda za biokemiju, literature i vremenima zadržavanja komercijalnih standarda. Na isti način uspoređivani su i spektri masa sa Wiley 7, NIST 02 i drugim bazama podataka. Važno je naznačiti da se tijekom prve 3 minute ne snima maseni spektar jer tada prolazi otapalo (pentan).



Slika 35. Identifikacija spojeva nakon GC-MS analize

2.4. Pribor i kemikalije

Potrebni pribor za metode određivanja antioksidacijske aktivnosti te inhibicije acetil- i butirilkolinesteraze je jednak jer se radi o spektrofotometrijskim metodama. Za sve od navedenih metoda bilo je potrebno koristiti spektrometar i mikrotitratske pločice.

Od kemikalija za FRAP metodu koristio se FRAP reagens koji se priprema miješanjem: 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ (2,4,6,-tripiridil-s-triazin) reagensa te 2,5 mL otopine FeCl_3 .

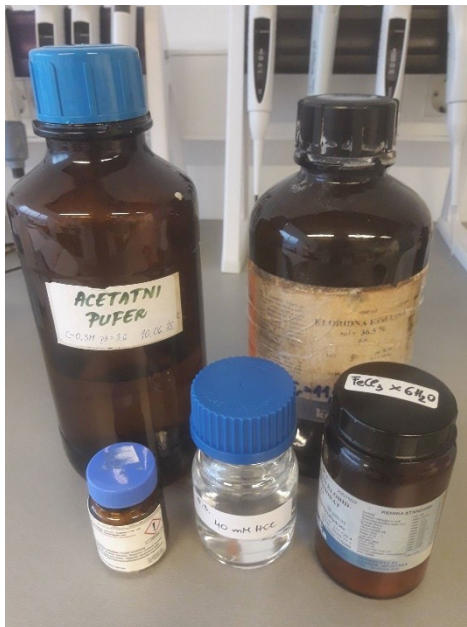
Priprema kemikalija za DPPH metodu vrlo je jednostavna. Otopina DPPH priprema se otapanjem 4 g DPPH u 100 mL etanola.

Kemikalije korištene pri ispitivanju sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze su: 20 μL enzima AChE otopljenog u 5 mL fosfatnog pufera pH = 8, zatim 15,9 mg ATChI otopljenog u 5 mL fosfatnog pufera pH = 8 te 13,079 mg DTNB reagensa otopljenog u 5 mL fosfatnog pufera pH = 7 + 0,12 mM NaHCO_3 .

Kemikalije korištene pri ispitivanju sposobnosti inhibicije butirilkolinesteraze su: 14 μL enzima BChE otopljenog u 5 mL fosfatnog pufera pH = 8, zatim 17,45 mg BTChI otopljenog u 5 mL fosfatnog pufera pH = 8 te 13,079 mg DTNB reagensa otopljenog u 5 mL fosfatnog pufera pH = 7 + 0,12 mM NaHCO_3 .

2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda je vrlo praktična i jednostavna metoda koja služi za određivanje redukcijske sposobnosti nekog antioksidansa u kojoj žuto obojeni kompleks Fe^{III} -TPTZ mijenja boju reducirajući se u plavi Fe^{II} -TPTZ oblik pri valnoj duljini od 593 nm.



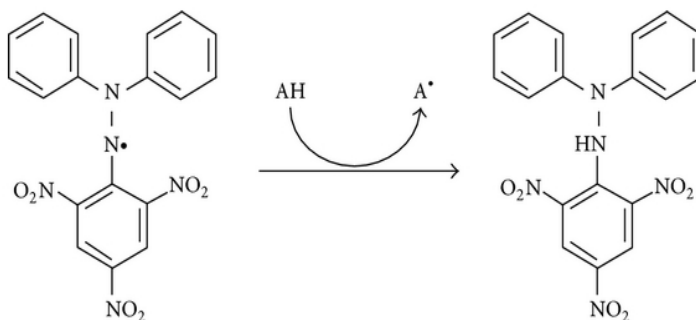
Slika 36. Kemikalije potrebne za FRAP metodu

Postupak:

Pripremljenoj otopini FRAP reagensa očita se vrijednost apsorbancije pri 593 nm. U 225 μL navedene otopine doda se 10 μL uzorka te se mjeri apsorbancija kroz vrijeme od 8 minuta na način da se očitavanja provode svakih 25 sekunda. Važno je da očitavanja u 4. i 8. minuti imaju slične vrijednosti. Računanje FRAP vrijednosti provodi se iz jednadžbe pravca ovisnosti promjene apsorbancije o koncentraciji Fe^{2+} , koji služi kao standard. Jedna FRAP jedinica odgovara redukciji jednog mola Fe^{3+} u Fe^{2+} . Promjena apsorbancije izračunana je kao razlika između konačne i početne vrijednosti te se uspoređuje s vrijednostima koje su dobivene za otopinu standarda. Ona ovisi o vremenu trajanja reakcije i koncentraciji antioksidansa.

2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH metodom ljubičasto obojeni radikal 2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil se, dodavanjem antioksidansa, reducira (slika 37.) pri čemu dolazi do promjene boje u žutu, odnosno dolazi do sniženja apsorbancije koje se prati spektrofotometrijski.



Slika 37. Reakcija DPPH i antioksidansa

Postupak:

U mikrotitarsku pločicu stavljeno je 210 μL pripravljene otopine DPPH i izmjerena je apsorbancija pri 517 nm što je poslužilo kao slijepa proba. Potom je dodano po 10 μL uzorka s različitim razrjeđenjima te se pratila promjena apsorbancije pri 517 nm u odnosu na početnu otopinu reagensa. Mjerenje traje 60 minuta, a očitavanja se provode u svakoj minuti. Postotak inhibicije DPPH radikala računa se:

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

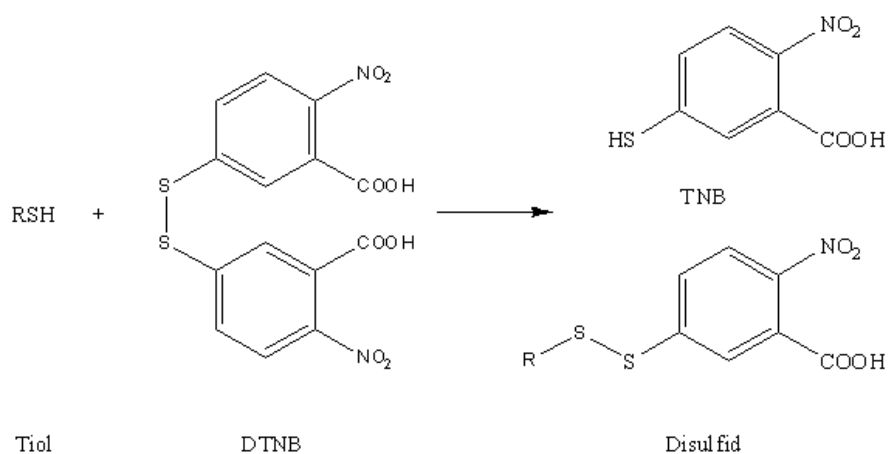
gdje je:

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

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

2.7. Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze

Acetilkolinesteraza (AChE) iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S) korištena je kao izvor enzima, a acetiltiokolin jodid (ATChI) kao supstrat enzima. Korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu s DTNB-om (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina) kao tiolnim reagensom. Enzimskom hidrolizom supstrata nastaje tiokolin koji reagira s DTNB-om pri čemu se oslobađa 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) koja dalje u vodi ionizira u žuti TNB⁻ anion kod neutralnog ili lužnatog pH, a porast apsorbancije aniona mjeri se pri valnoj duljini od $\lambda = 412 \text{ nm}$ (slika 38.).



Slika 38. Ellmanova reakcija za određivanje tiola

Postupak:

U svakoj jažici reakcijska smjesa sadrži:

- 180 μL 0,1 mol L^{-1} fosfatnog pufera pH = 8,
- 10 μL 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzojeve kiseline)-DTNB,
- 10 μL acetilkolinesteraze-AChE (koncentracija u smjesi iznosi 0,03 U mL^{-1}),
- 10 μL acetiltiokolinjodida-ATChI (koncentracija u smjesi iznosi 0,5 mmol L^{-1}),
- 10 μL uzorka određene koncentracije otopljenog u etanolu ili samog etanola u slučaju kontrolnog mjerenja.

Tablica 5. Shema otopina u eksperimentu

	kontrola vode	kontrola EtOH	BL1	BL2	uzorak M	uzorak BL
puffer	190	180	200	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10	10
uzorak	/	/	/	/	10	10
EtOH	/	10	/	/	/	/
AChE	10	10	/	10	10	/
ATChI	10	10	10	10	10	10

Uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 5., s tim da se supstrat ATChI dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da njime započinje reakcija. Konačni volumen smjese iznosi 220 μL . Kod mjerenja kontrole koristi se etanol, a kod praćenja ne-enzimske hidrolize ("blank" mjerenja) u jednoj slijepoj probi izostavljen je AChE. Mjerenje se obavlja na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija) pri valnoj duljini od 405 nm uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo.

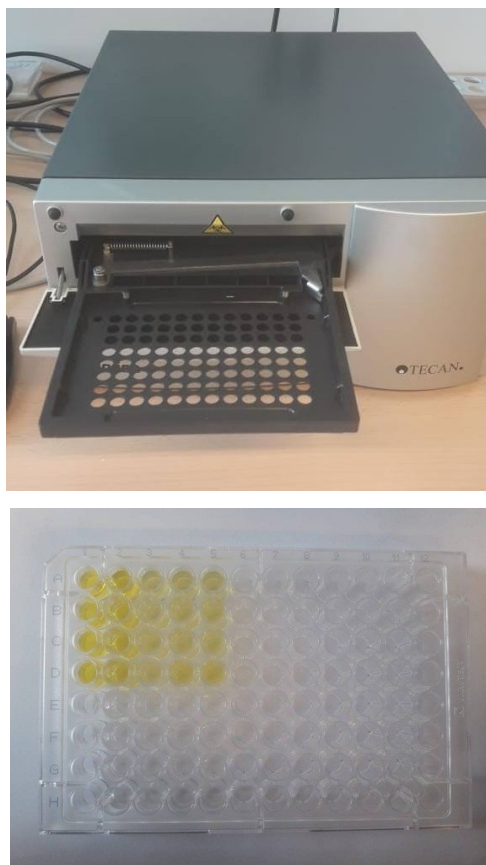
Sposobnost inhibicije enzima računa se prema izrazu:

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

gdje je:

A_K – apsorbancija test otopine,

A_A – apsorbancija kontrolnog uzorka.



Slika 39. Višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise" i jažice (Tecan, GmbH, Austrija)

2.8. Ispitivanje sposobnosti inhibicije butirilkolinesteraze

Butirilkolinesteraza (BChE) korištena je kao izvor enzima, a butiriltiokolin jodid (BTChI) kao supstrat enzima u ovoj metodi. Kao i kod ispitivanja sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze i u ovom slučaju je korištena modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu s DTNB-om (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina) kao tiolnim reagensom. Porast apsorbancije se također mjeri pri valnoj duljini od $\lambda = 412 \text{ nm}$.

Postupak:

U svakoj jažici reakcijska smjesa sadrži:

- 180 μL 0,1 mol L^{-1} fosfatnog pufera pH = 8,
- 10 μL 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzojeve kiseline)-DTNB,
- 10 μL butirilkolinesteraze-BChE (koncentracija u smjesi 0,03 U mL^{-1}),
- 10 μL butiriltiokolinjodida-BTChI (koncentracija u smjesi 0,5 mmol L^{-1}),
- 10 μL uzorka određene koncentracije otopljenog u etanolu ili samog etanola u slučaju kontrolnog mjerenja.

Tablica 6. Shema otopina u eksperimentu

	kontrola vode	kontrola EtOH	BL1	BL2	uzorak M	uzorak BL
pufer	190	180	200	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10	10
uzorak	/	/	/	/	10	10
EtOH	/	10	/	/	/	/
BChE	10	10	/	10	10	/
BTChI	10	10	10	10	10	10

Kao i u prethodnoj metodi, uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 6., supstrat BTChI dodaje se neposredno prije početka mjerenja. Konačni volumen smjese iznosi 220 μL . Kod mjerenja kontrole koristi se etanol, a kod praćenja ne-enzimske hidrolize ("blank" mjerenja) u jednoj slijepoj probi izostavljen je BChE.

Sposobnost inhibicije enzima računa se prema izrazu:

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

gdje je:

A_K – apsorbancija test otopine,

A_A – apsorbancija kontrolnog uzorka.

2.9. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom mikrodilucije

Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja ispitana je na ukupno 11 vrsta oportunističkih patogenih mikroorganizama, među kojima je 8 vrsta Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* (izolat iz hrane), *Clostridium perfringens* (izolat iz hrane), *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (1/2a), *Micrococcus luteus* (izolat iz okoliša) i *Streptococcus pneumoniae* (klinički izolat). Testirana je *Escherichia coli* ATCC 25922 kao predstavnik Gram-negativnih bakterija. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja testirano je na kvasnici *Candida albicans* ATCC 90029 te plijesni *Aspergillus niger* (izolat iz hrane).

Mikrobni sojevi su pohranjeni na -80 °C u Luria-Bertani tekućem mediju (Biolife, Italija) s dodatkom glicerola te subkultivirani na triptikaza sojinom agaru (TSA; Biolife) ili Sabouraud dekstroznom agaru (SDA; Biolife) u slučaju gljivica prije ispitivanja.

Testovi antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja metodom mikrodilucije za ispitivanje osjetljivosti bakterija, kvasaca i filamentoznih gljiva (plijesni) provedeni su prema smjernicama Instituta za kliničke laboratorijske standarde (CLSI, 2008a; 2008b; 2016), uz iznimku da je ispitivanje antifungalne osjetljivosti provedeno u Sabouraud dekstroznom bujonu (SDB; Biolife). Nekoliko bakterijskih kolonija uzeto je s ploče TSA agara i resuspendirano u 5 ml Mueller-Hinton tekućeg medija (MHB; Biolife, slika 40.) te inkubirano u tresilici preko noći na 37 °C pri 100 okretaja u minuti (slika 41.).



Slika 40. Mueller-Hinton Broth; Biolife



Slika 41. Inkubacija bakterijskih kolonija u tresilici

Prekonoćna kultura je zatim razrijeđena u omjeru 1:100 svježim MHB i inkubirana u tresilici 2 sata pri jednakim uvjetima do sredine logaritamske faze.

Ispitivanja su provedena u mikrotitarskim pločama sa 96 jažica nakon što su stanične kulture podešene spektrofotometrijski da bi se postigla optička gustoća koja odgovara broju od 10^8 bakterijskih stanica/ml, te $0.5-2.5 \times 10^3$ spora / mL za kvasce te $0.4-5 \times 10^4$ spora / mL za plijesni. Korištene koncentracije eteričnih ulja navedene su u tablici 7. U prvoj jažici je dodano 60 μ L eteričnog ulja i 40 μ L MHB, a potom napravljeno serijsko razrjeđenje prebacivanjem 50 μ L otopine u 2. jažicu, zatim iz 2. jažice u 3. jažicu i tako redom dalje. Prethodno je u jažice dodan MHB. Nakon toga, alikvot od 50 μ L suspenzije mikroorganizama dodan je u 50 μ L serijskih razrjeđenja ispitivanih ulja pri čemu je u svakoj idućoj jažici koncentracija ulja bila dvostruko manja. Najveće testirane koncentracije ulja navedene su u tablici 7. Mikrotitarske pločice su inkubirane 18 sati na 37 °C kod testiranja bakterija i kvasaca te 48 sati na 28 °C u slučaju plijesni. Nakon inkubacije vizualno je određena minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ulja kao najniža koncentracija koja u potpunosti inhibira bakterijski rast, odnosno nema vidljivog замуćenja u jažici. U cilju određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBK), alikvoti iz jažica koje odgovaraju vrijednostima MIK, 2x MIK i 4x MIK su inokulirani na pločama (slika 42.) Mueller-Hinton agara (MHA; Biolife, slika 43.).



Slika 42. Inokulacija alikvota iz jažica (MIK, 2x MIK i 4x MIK) na pločama



Slika 43. Mueller-Hinton agar; Biolife)

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 sojeve gljivica, odgovarajući alikvoti iz svih jažica su nasijani na SDA i inkubirani 24 i 48 h, za kvasce, odnosno plijesni. Nakon vizualnog pregleda i brojanja kolonija, MIK₅₀ i MIK₉₀ su zabilježeni kao najniža koncentracija koja inhibira 50 %

odnosno 90 % rasta gljivica u usporedbi s rastom kontrole (bez dodatka eteričnog ulja). Svi eksperimenti su napravljeni u triplikatu (tri ponavljanja).⁴⁵⁻⁴⁷

Tablica 7. Vrste i koncentracije eteričnih ulja

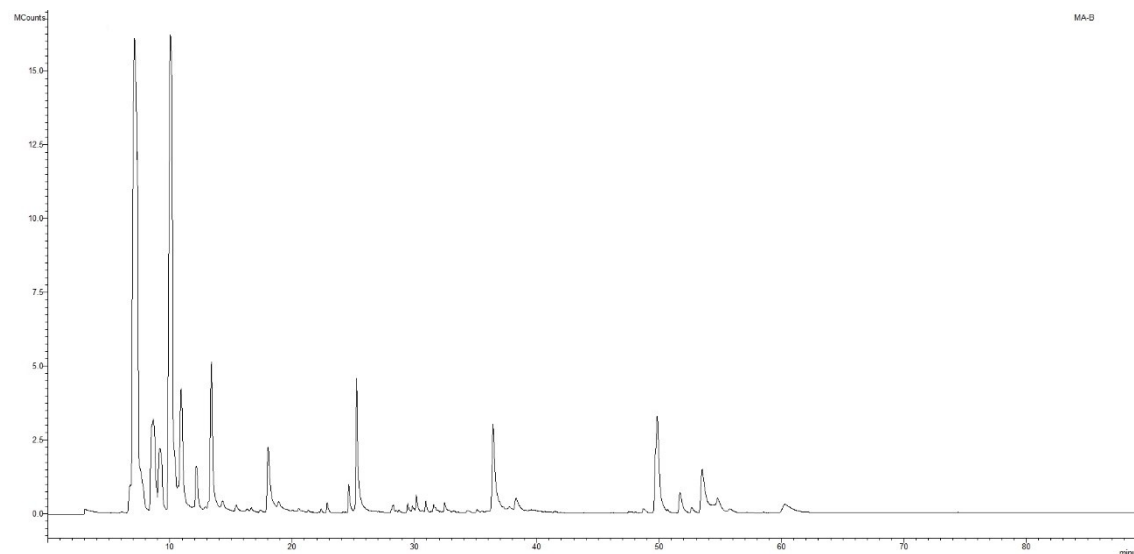
Vrsta eteričnog ulja	Početna koncentracija ulja (mg mL ⁻¹)	Koncentracija ulja u prvoj jažici nakon dodatka inokuluma (μg mL ⁻¹)
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	44,84	13452
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	48,83	14649
<i>Pinus halepensis</i> Miller	14,13	4239

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

Eterično ulje iz iglica čempresa (*Cupressus sempervirens* L.), gluhača (*Juniperus phoenicea* L.) i alepskog bora (*Pinus halepensis* Miller) analizirano je vezanim sustavom GC-MS te mu je na taj način određen kemijski sastav. Kromatogrami dobiveni analizom prikazani su na slikama 44., 47. i 49., a najzastupljeniji spojevi u smjesi eteričnog ulja u tablicama 8., 9. i 10., dok su strukture najzastupljenijih spojeva prikazane na slikama 46., 48., 55. i 56.). Spojevi u tablicama poredani su po vremenu zadržavanja, a udio svakog spoja u uzorku predstavlja udio površine pika tog spoja u ukupnoj površini pikova.

3.1.1. Kemijski sastav eteričnog ulja iz iglica čempresa (*C. sempervirens*)

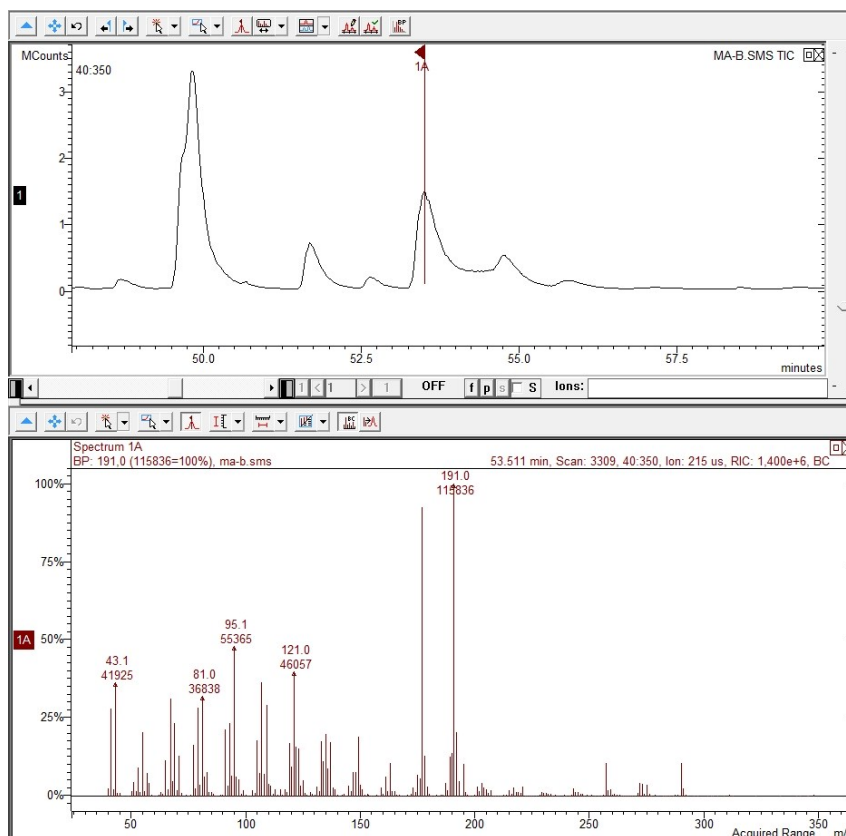


Slika 44. Kromatogram eteričnog ulja iz iglica čempresa (*C. sempervirens*)

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

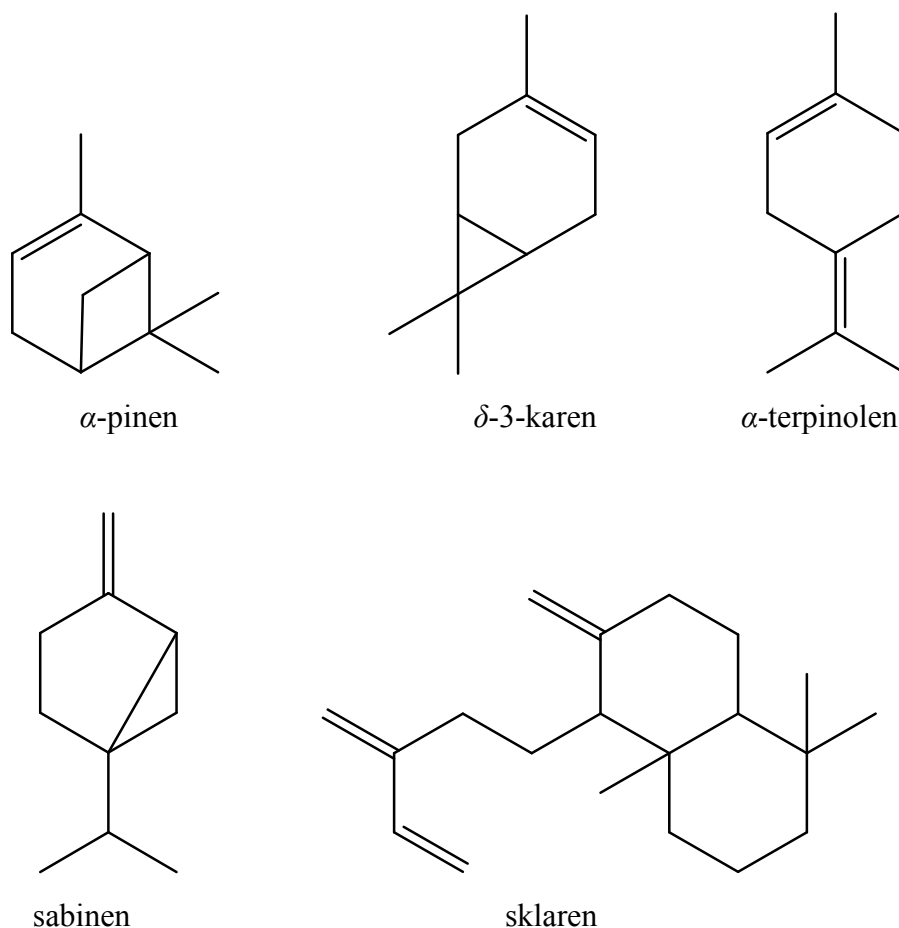
Klase spojeva	Naziv spoja	%	KI	Ni
Monoterpenoidi				
1.	α -pinen	32,75	924	MS, RI, St
2.	sabinen	5,34	970	MS, RI
3.	β -pinen	3,05	981	MS, RI, St
4.	δ -3-karen	24,26	1003	MS, RI
5.	limonen	3,97	1024	MS, RI, St
6.	γ -terpinen	1,42	1053	MS, RI, St
7.	α -terpinolen	5,46	1078	MS, RI
8.	terpinen-4-ol	3,24	1178	MS, RI, St
9.	α -terpineol	0,20	1194	MS, RI
10.	4-terpinenil acetat	0,62	1319	MS, RI
11.	α -terpinil acetat	3,73	1336	MS, RI
Seskviterpenoidi				
12.	α -cedrol	3,54	1598	MS, RI
13.	α -kadinol	0,60	1651	MS, RI
Diterpenoidi				
14.	sklaren	5,12	1953	MS, RI
15.	abietatrien	0,90	2034	MS, RI
16.	kauren	0,20	2067	MS, RI
17.	5-(7a-Izopropenil-4,5-dimetil-oktahidroinden-4-il)-3-metil-pent-2-en-1-ol ^A	2,13	2093	MS
Ukupno:		96,53		

% - 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.



Slika 45. Kromatogram i maseni spektar 5-(7a-Isopropenil-4,5-dimetil-oktahidroinden-4-il)-3-metil-pent-2-en-1-ola^A

U kromatogramu eteričnog ulja čempresa pik 5-(7a-Isopropenil-4,5-dimetil-oktahidroinden-4-il)-3-metil-pent-2-en-1-ola^A spoja izlazi na vremenu zadržavanja od 53,511 minuta, a u masenom spektru vidljiv je molekulski ion $m/z = 292$ te osnovni ion $m/z = 191$. Spoj je identificiran samo usporedbom masenog spektra s ponuđenim masenim spektrima iz baza podataka (Wiley 7, NIST 02).

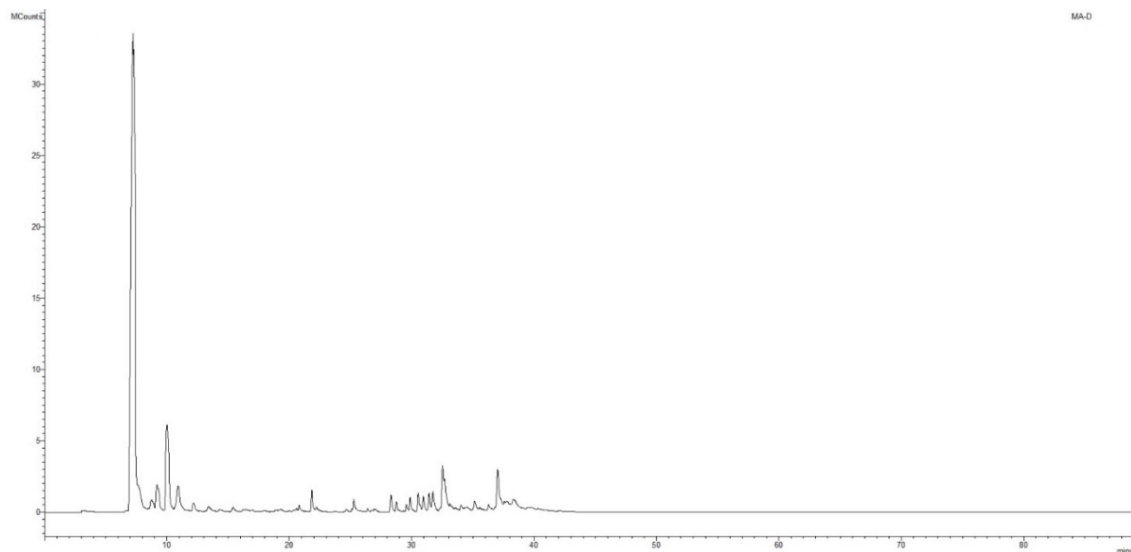


Slika 46. Strukturne formule pojedinih spojeva detektiranih u eteričnom ulju iz iglica čempresa

U eteričnom ulju čempresa koje je izolirano vodenom destilacijom po Clevengeru identificirano je 16 spojeva. Spojevi u tablici 8. od rednog broja 1. do 11. pripadaju monoterpenima (84,04 %), s tim da su terpinen-4-ol i α -terpineol alkoholi, a 4-terpinenil acetat i α -terpinil acetat esteri. Spojevi pod rednim brojem 12. i 13. pripadaju seskviterpenskim alkoholima (4,14 %). Posljednja četiri spoja u tablici (14.-18.) pripadaju diterpenima (8,35 %). Najveći udio zauzima α -pinen (32,75 %), biciklički monoterpenski spoj koji već pri niskoj koncentraciji posjeduje protuupalna, antimikrobna i gastroprotektivna svojstva te inhibitorna svojstva protiv enzima acetilkolinesteraze. Drugi najzastupljeniji spoj je δ -3-karen (24,26 %), također biciklički monoterpenski spoj, odnosno bezbojna tekućina slatkog mirisa nalik terpentinu. Ovaj spoj ima izrazito jak protuupalni učinak, pri dodiru s kožom aktivira vlastite protuupalne obrambene snage. Nakon toga, po zastupljenosti u eteričnom ulju, slijede redom: α -terpinolen (5,46 %) i sabinen (5,34 %) koji spadaju u cikličke monoterpe te sklaren

(5,12 %) koji je diterpen. Slični su i rezultati GC-MS analize eteričnog ulja čempresa iz znanstvenog članka (Selim *et. al.*, 2014)⁴⁸ kojem je također najzastupljeniji spoj α -pinen (48,6 %), a drugi je δ -3-karen (22,1 %).

3.1.2. Kemijski sastav eteričnog ulja iz iglica gluhača (*J. phoenicea*)

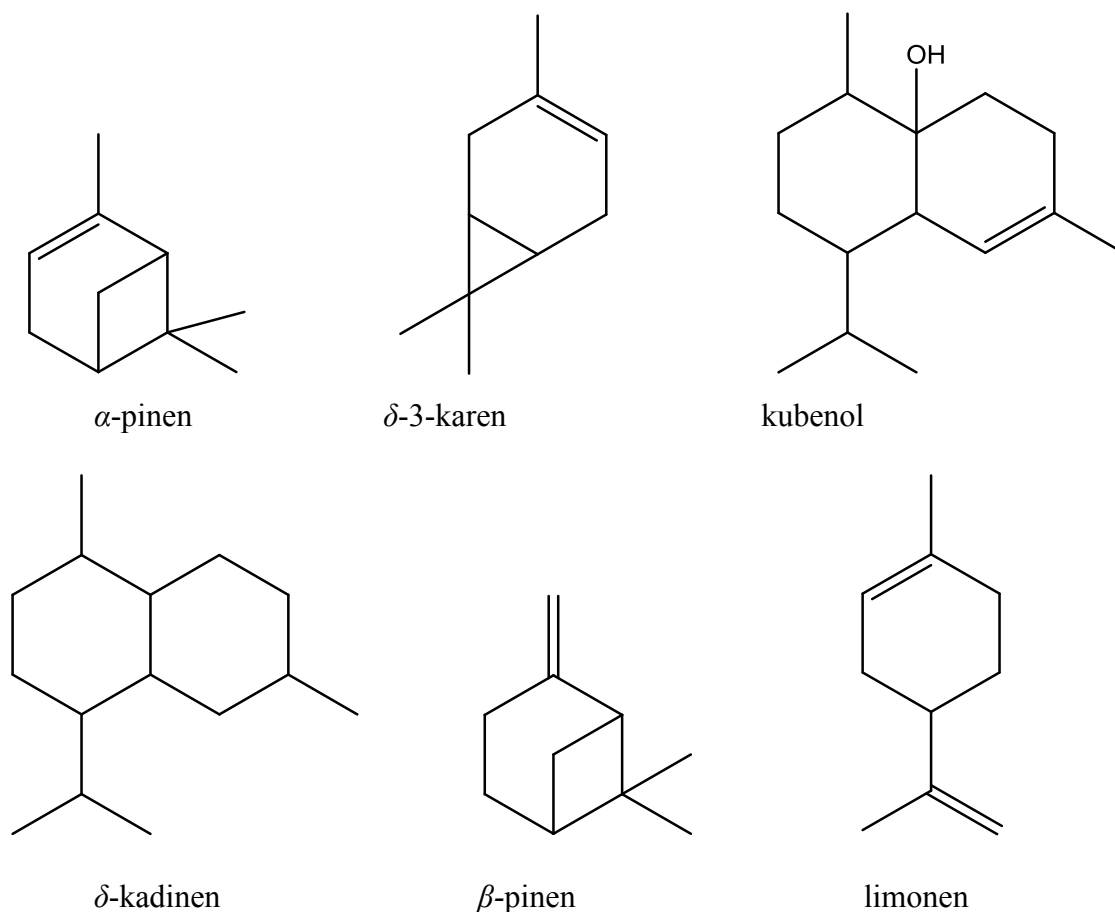


Slika 47. Kromatogram eteričnog ulja iz iglica gluhača (*J. phoenicea*)

Tablica 9. Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja iz iglica gluhača

Redni broj	Naziv spoja	%	KI	Ni
Monoterpenoidi				
1.	α -pinen	61,34	924	MS, RI, St
2.	sabinen	0,80	970	MS, RI
3.	β -pinen	2,29	981	MS, RI, St
4.	δ -3-karen	7,84	1003	MS, RI
5.	limonen	2,29	1024	MS, RI, St
6.	γ -terpinen	0,55	1053	MS, RI, St
7.	α -terpinolen	0,53	1078	MS, RI
8.	linalool	0,18	1096	MS, RI, St
9.	linalil acetat	0,30	1238	MS, RI
10.	izopulegil acetat	1,14	1261	MS, RI
11.	4-terpinenil acetat	0,15	1319	MS, RI
12.	α -terpinil acetat	0,65	1336	MS, RI
Seskviterpenoidi				
13.	α -kopaen	0,17	1362	MS, RI
14.	<i>trans</i> -kariofilen	0,86	1403	MS, RI
15.	γ -elemen	0,57	1413	MS, RI
16.	β -kopaen	0,34	1434	MS, RI
17.	α -humulen	0,69	1441	MS, RI
18.	β -kadinen	0,96	1457	MS, RI
19.	γ -muurolen	0,78	1466	MS, RI
20.	germakren D	0,88	1477	MS, RI
21.	valencen	1,41	1484	MS, RI
22.	γ -kadinen	2,18	1497	MS, RI
23.	δ -kadinen	3,29	1503	MS, RI
24.	kariofilen oksid	0,64	1569	MS, RI, St
25.	kubenol	4,34	1616	MS, RI
Ukupno:				
		95,17		

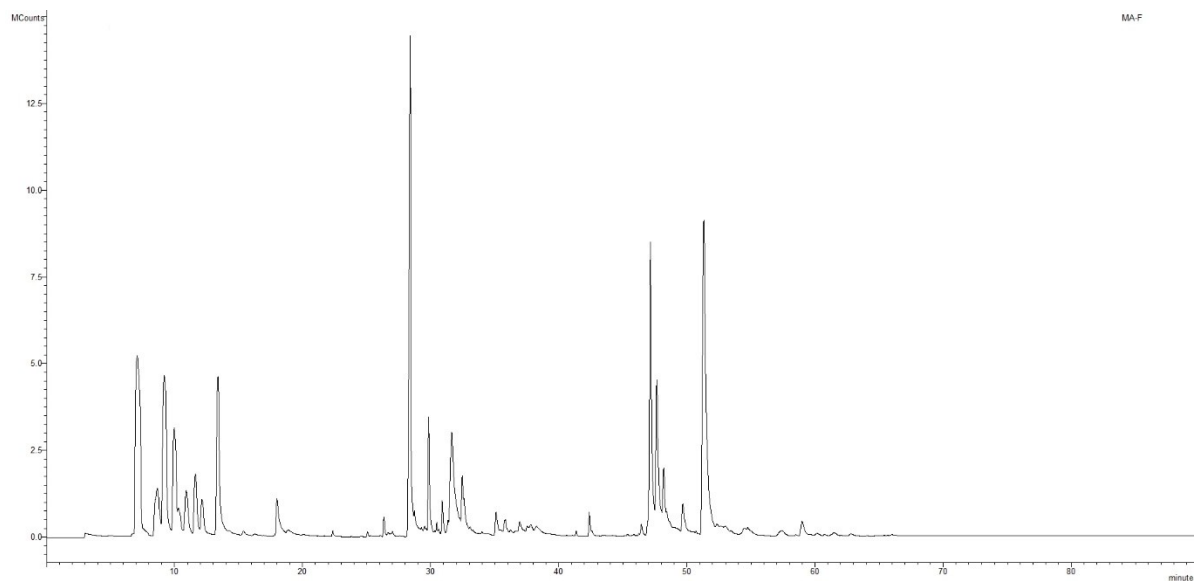
% - udio pojedinog spoja u eteričnom ulju, KI – Kovačevi indeksi za VF-5MS kolonu, Ni – način identifikacije, MS – identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara (Wiley 7 i NIST 02), RI - identifikacija potvrđena literaturnim Kovačevim retencijskim indeksom, St – identifikacija potvrđena komercijalnim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



Slika 48. Strukturne formule pojedinih spojeva detektiranih u eteričnom ulju iz iglica gluhača

U eteričnom ulju gluhača identificirano je ukupno 25 spojeva. Spojevi u tablici 9. od rednog broja 1. do 12. pripadaju monoterpenima (78,06 %), s tim da je linalool alkohol, a iduća četiri spoja (9.-12.) su esteri. Spojevi od rednog broja 13. do 25. pripadaju seskviterpenima (17,11 %), s tim da je kariofilen oksid eter, a kubenol alkohol. Najveći udio uvjerljivo zauzima α -pinen (61,34 %). Nakog njega, redom slijede ovi spojevi: δ -3-karen (7,84 %), kubenol (4,34 %), δ -kadinen (3,29 %), β -pinen (2,29 %) te limonen (2,29 %). Od navedenih spojeva, kubenol i δ -kadinen pripadaju seskviterpenima, dok su ostali monoterpeni. Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja gluhača iz znanstvenih članaka (El-Sawi *et. al.*, 2007)⁴⁹ i (Mazari *et al.*, 2010)⁵⁰ također pokazuju da je najzastupljeniji spoj α -pinen, no on je prisutan u duplo manjem udjelu.

3.1.3. Kemijski sastav eteričnog ulja iz iglica alepskog bora (*P. halepensis*)

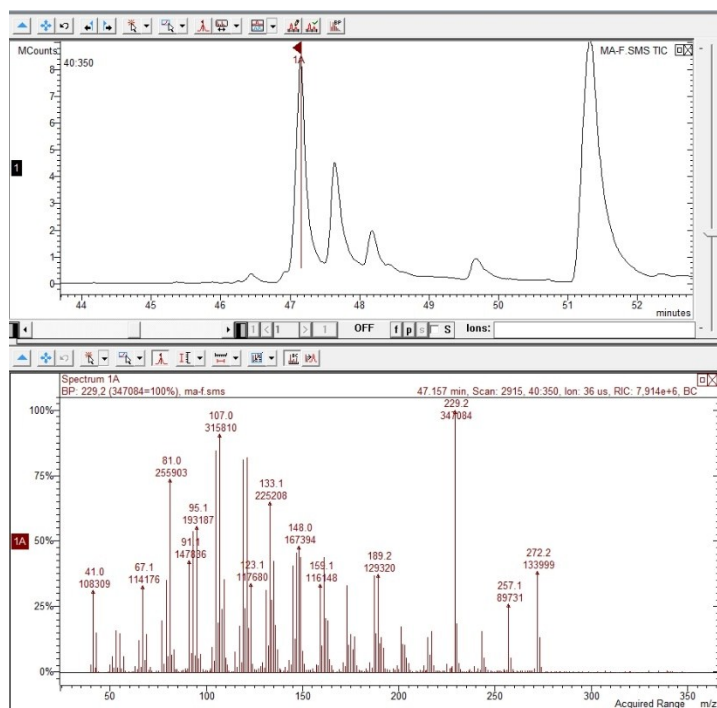


Slika 49. Kromatogram eteričnog ulja iz iglica alepskog bora (*P. halepensis*)

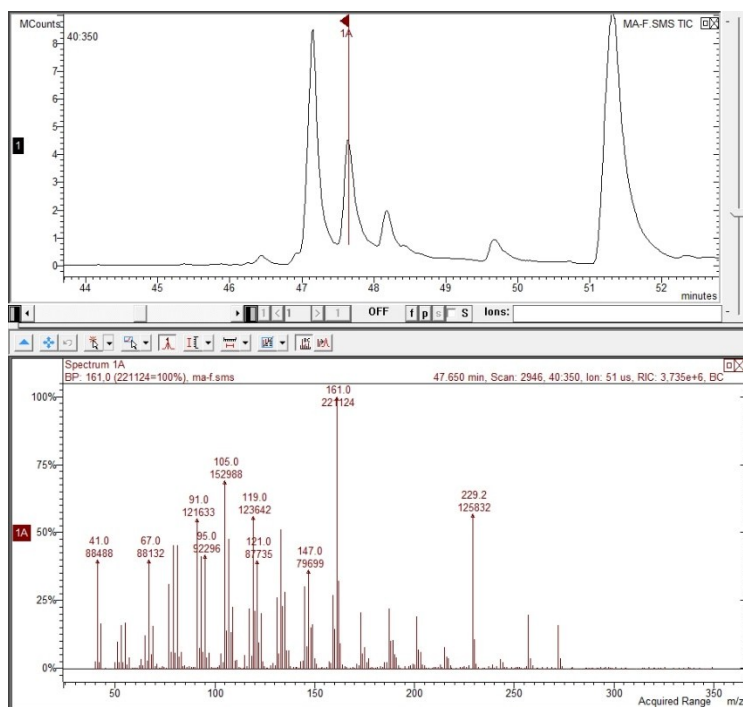
Tablica 10. Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja iz iglica alepskog bora

Redni broj	Naziv spoja	%	KI	Naziv spoja
Monoterpenoidi				
1.	α -pinen	11,96	924	MS, RI, St
2.	sabinen	3,12	970	MS, RI
3.	β -pinen	9,07	981	MS, RI, St
4.	δ -3-karen	6,56	1003	MS, RI
5.	α -terpinen	0,18	1014	MS, RI
6.	limonen	1,82	1024	MS, RI, St
7.	(<i>E</i>)- β -ocimen	2,54	1041	MS, RI
8.	γ -terpinen	1,39	1053	MS, RI, St
9.	α -terpinolen	6,46	1078	MS, RI
10.	terpinen-4-ol	1,65	1178	MS, RI, St
Seskviterpenoidi				
11.	α -kopaen	0,35	1362	MS, RI
12.	<i>trans</i> -kariofilen	12,00	1403	MS, RI, St
13.	α -humulen	2,23	1441	MS, RI
14.	γ -muurolen	0,72	1466	MS, RI
15.	feniletil-3-metilbutanoat	4,32	1482	MS, RI
16.	δ -kadinen	1,00	1503	MS, RI
17.	kariofilen oksid	0,60	1569	MS, RI, St
Diterpenoidi				
18.	cembren ^B	7,91	1896	MS
19.	(3 <i>E</i>)-cembren A ^C	5,10	1911	MS
20.	(3 <i>Z</i>)-cembren A ^D	1,33	1927	MS
21.	verticilol ^E	1,00	1973	MS
22.	kaur-16-en	16,77	2023	MS, RI
23.	metil levopimarat ^F	0,71	2278	MS
	Ukupno:	98,79		

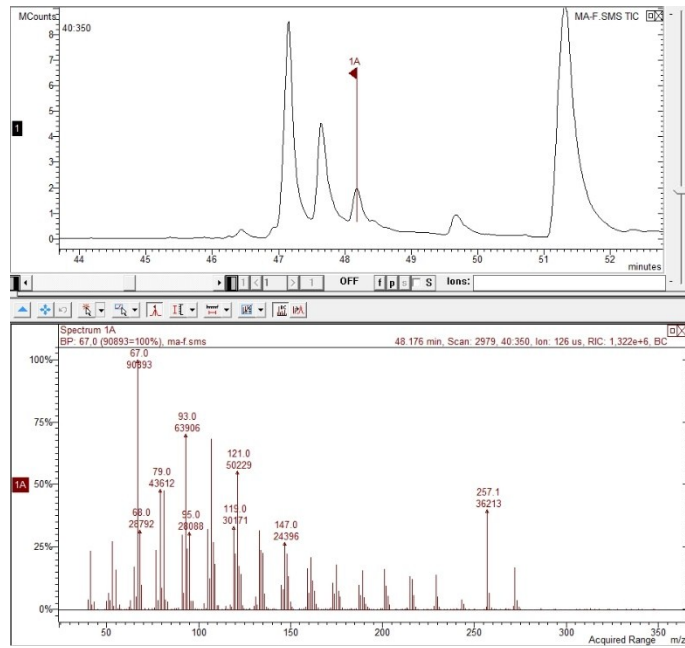
% - udio pojedinog spoja u eteričnom ulju, KI – Kovačevi indeksi za VF-5MS kolonu, Ni – način identifikacije, MS – identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara (Wiley 7 i NIST 02), RI - identifikacija potvrđena literaturnim Kovačevim retencijskim indeksom, St – identifikacija potvrđena komercijalnim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



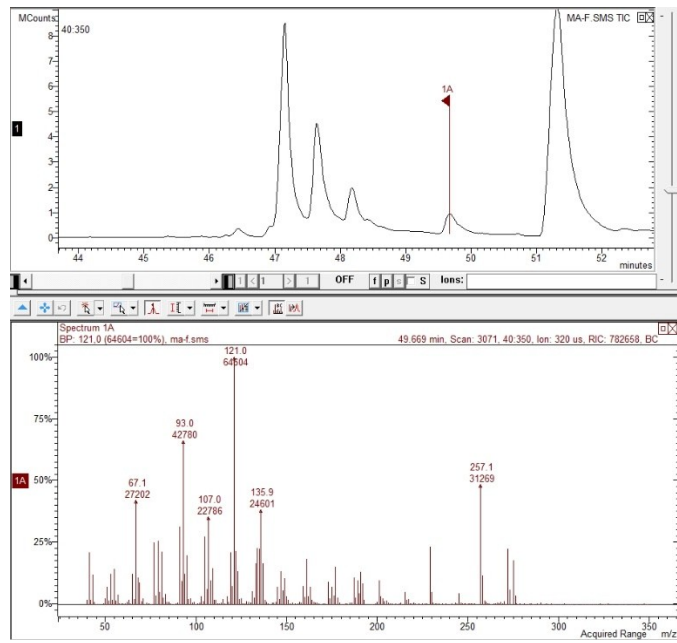
Slika 50. Kromatogram i maseni spektar cembrena^B



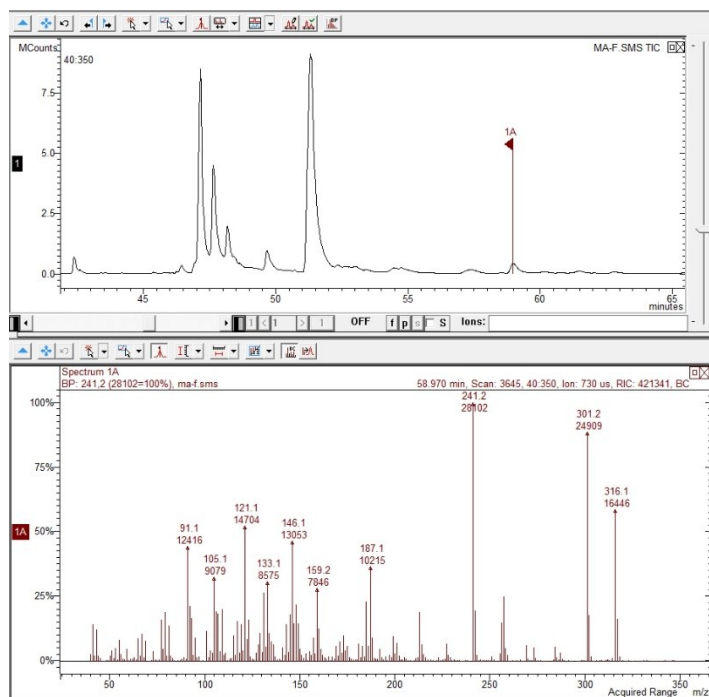
Slika 51. Kromatogram i maseni spektar (3E)-cembrena A^C



Slika 52. Kromatogram i maseni spektar (3Z)-cembrena A^D

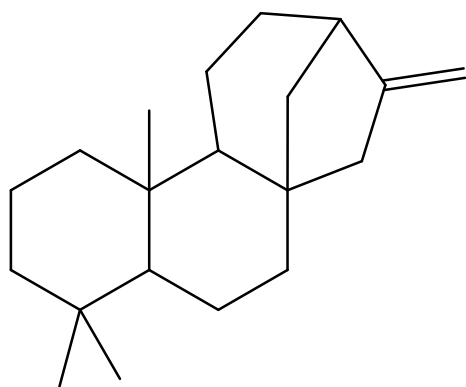


Slika 53. Kromatogram i maseni spektar verticilola^E

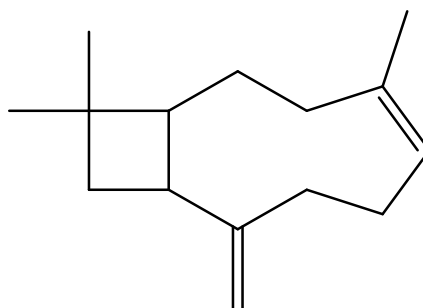


Slika 54. Kromatogram i maseni spektar metil levopimarata^F

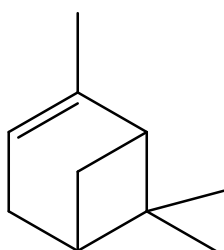
U kromatogramu eteričnog ulja alepskog bora u vremenu od 47 do 59 min (slike 50.-54.) nalazimo pikove diterpena. Pik cembrena^B nalazi se na 47,157 minuti, u masenom spektru vidljiv je osnovni ion $m/z = 229$. Spoj (3*E*)-cembren A^C nalazi se na 47,650 minuti, a njegov osnovni ion jest $m/z = 161$. Pik (3*Z*)-cembrena A^D vidljiv je na 48,176 minuti, a osnovni ion jest $m/z = 67$. Kako se radi od cembrenu i njegovim izomerima sva tri navedena diterpena imaju molekularni ion $m/z = 272$. Verticilol^E izlazi na 49,669 minuti kromatograma, molekularni ion uočava se kao $m/z = 290$, a osnovni ion kao $m/z = 121$. Vrijeme zadržavanja metil levopimarata^F je 58,970 minuta, molekularni ion se uočava $m/z = 316$, a osnovni ion $m/z = 241$. Navedeni spojevi su identificirani samo usporedbom njihovih masenih spektara s ponuđenim masenim spektrima iz baza podataka (Wiley 7, NIST 02).



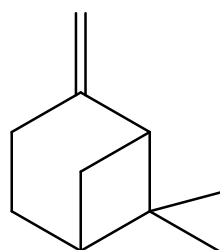
kaur-16-en



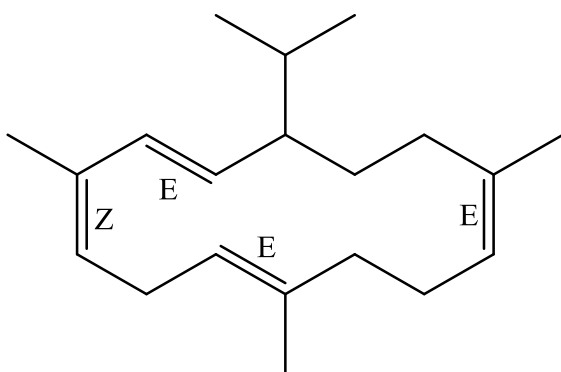
trans-kariofilen



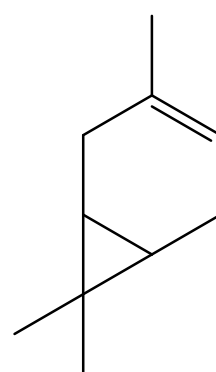
α -pinen



β -pinen

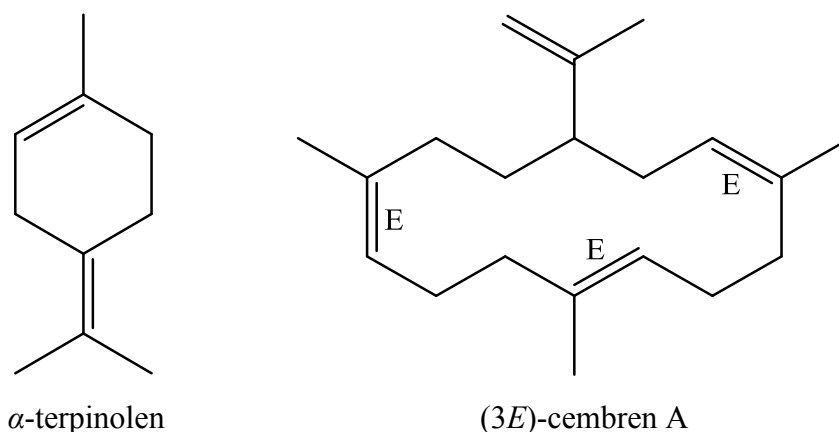


cembren



δ -3-karen

Slika 55. Strukturne formule pojedinih spojeva detektiranih u eteričnom ulju iz iglica alepskog bora



Slika 56. Strukturne formule pojedinih spojeva detektiranih u eteričnom ulju iz iglica alepskog bora

U eteričnom ulju alepskog bora identificirano je ukupno 18 spojeva. Spojevi u tablici 10. od rednog broja 1. do 10. pripadaju monoterpenima (44,75 %), s tim da je terpinen-4-ol alkohol. Nadalje, spojevi od rednog broja 11. do 17. pripadaju seskviterpenima (16,90 %), izuzev feniletil-3-metilbutanoata (4,32 %) koji nije terpeni spoj, već samo spada u skupinu estera. Spojevi od rednog broja 18. do 23. pripadaju diterpenima (32,82 %), s tim da je verticilol alkohol, a metil levopimarit ester. Najveći udio zauzima kaur-16-en (16,77 %). Nakon njega slijede: *trans*-kariofilen (12,00%), α -pinen (11,96 %), β -pinen (9,07 %), δ -3-karen (6,56 %) te α -terpinolen (6,46 %). Kaur-16-en spada u diterpene, *trans*-kariofilen u seskviterpene, a ostali su monoterpeni. Kariofilen je sastojak mnogih eteričnih ulja (posebno klinčića, ružmarina, hmelja), posjeduje antioksidacijska svojstva i karakterističan je po ciklobutanskom prstenu koji se rijetko nalazi u prirodi zbog svoje nestabilnosti. Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja alepskog iz znanstvenog članka (Abi-Ayad *et. al.*, 2011)⁵¹ dosta se razlikuju. Pokazuju da je najzastupljeniji spoj kariofilen oksid (48,15 %), a nakon njega slijede: tumbergol (8,33 %), humulen oksid (6,67 %), fenetil-valerat (5,79 %) te kariofilen (2,96 %).

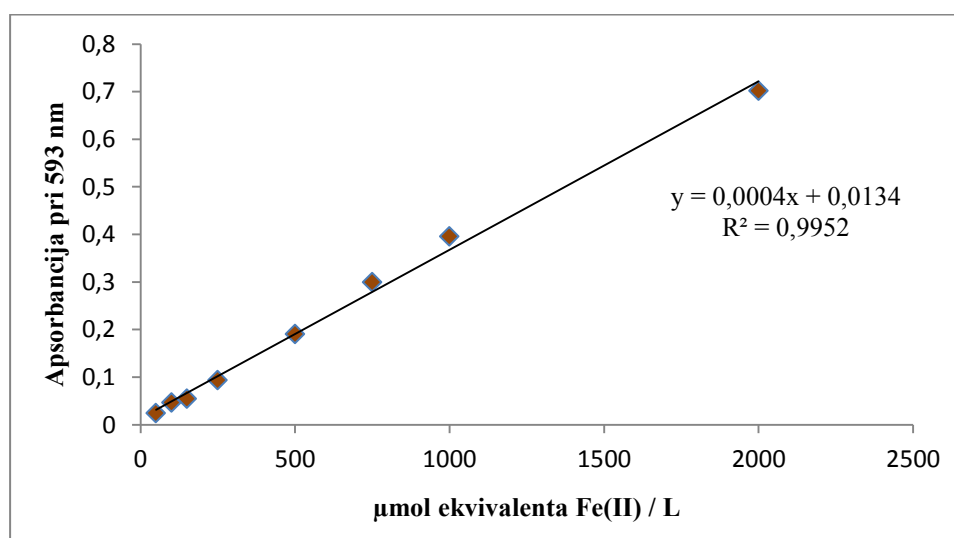
3.2. Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja određena FRAP metodom

Potrebni podaci za izradu baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije pri 593 nm o koncentraciji ekvivalenta Fe(II) prikazani su u tablici 11.

Tablica 11. Prikaz podataka za baždarni pravac za određivanje FRAP vrijednosti

c (FeSO ₄ × 7H ₂ O) / μmol	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

Za izradu baždarnog pravca (slika 57.) koriste se otopine standarda, FeSO₄ × 7H₂O, poznatih koncentracija u rasponu od 125 – 1000 μmol L⁻¹. Iz dobivenih podataka (tablica 11.) konstruira se baždarni pravac koji prikazuje ovisnost apsorbancije pri 593 nm o koncentraciji ekvivalenta Fe(II).



Slika 57. Baždarni pravac standarda (FeSO₄ × 7H₂O) za određivanje FRAP vrijednosti

Korištene su različite koncentracije uzoraka za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom. Antioksidacijska aktivnost prikazana je redukcijskim indeksom FRAP koji je izražen u μmol ekvivalenta Fe(II) po litri uzorka. Pri najvećoj koncentraciji od $21,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ eterična ulja čempresa i gluhača nisu pokazala aktivnost, dok je eterično ulje alepskog bora pri istoj koncentraciji pokazalo $1,5 \mu\text{mol}$ ekvivalenta Fe(II) / L. Eksperimentalni rezultati pokazuju da eterična ulja čempresa, gluhača i alepskog bora ne posjeduju antioksidacijsku aktivnost što se može pripisati njihovom kemijskom sastavu koji obiluje terpenskim ugljikovodicima, dok je količina spojeva s kisikom, koji bi mogli utjecati na bolju antioksidacijsku aktivnost, vrlo mala.

3.3. Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja određena DPPH metodom

U svrhu ispitivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom korištene su tri vrste uzoraka eteričnog ulja različitih koncentracija. Pri najvećoj koncentraciji od $22,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ eterično ulje čempresa imalo je najveću aktivnost, a ona iznosi 6,42 %. Slijedi uzorak alepskog bora čiji rezultat iznosi 4,95 %, a uzorak eteričnog ulja gluhača pri istoj koncentraciji nije pokazao aktivnost. Eksperimentalni rezultati i ove antioksidacijske metode također pokazuju da eterična ulja iz iglica čempresa, gluhača i alepskog bora nemaju veliku antioksidacijsku aktivnost. Razlozi za to su jednaki kao i kod prethodne metode, malo je spojeva koji bi eventualno mogli više utjecati na povećanje antioksidacijske aktivnosti.

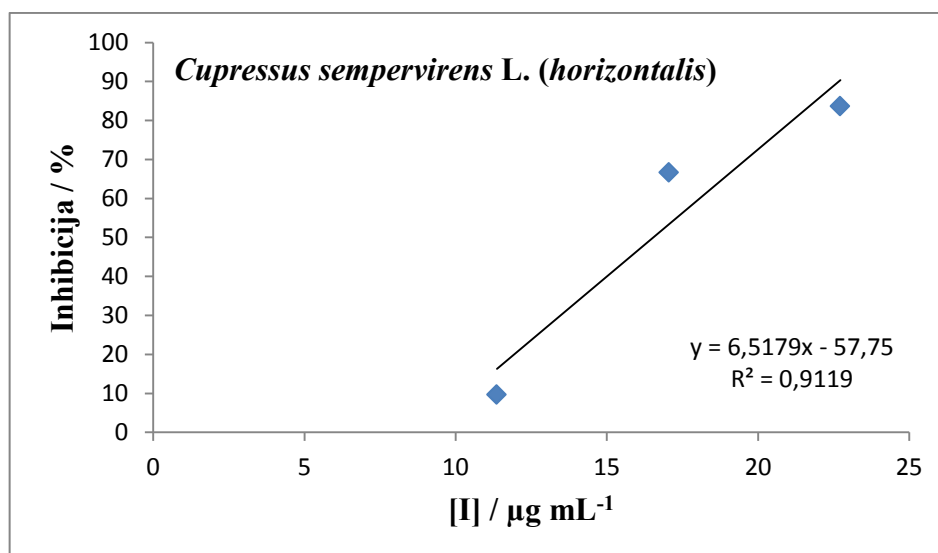
3.4. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze

Ispitana je sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze metodom po Ellmanu. Određen je postotak inhibicije za različite koncentracije uzoraka eteričnih ulja iz iglica čempresa, gluhača i alepskog bora. Rezultati inhibicijskog djelovanja različitih koncentracija uzorka na enzim acetilkolinesterazu prikazani su u tablici 12., a prikaz ovisnosti postotka inhibicije o koncentraciji eteričnih ulja čempresa i alepskog bora prikazan je na slikama 58. i 59.

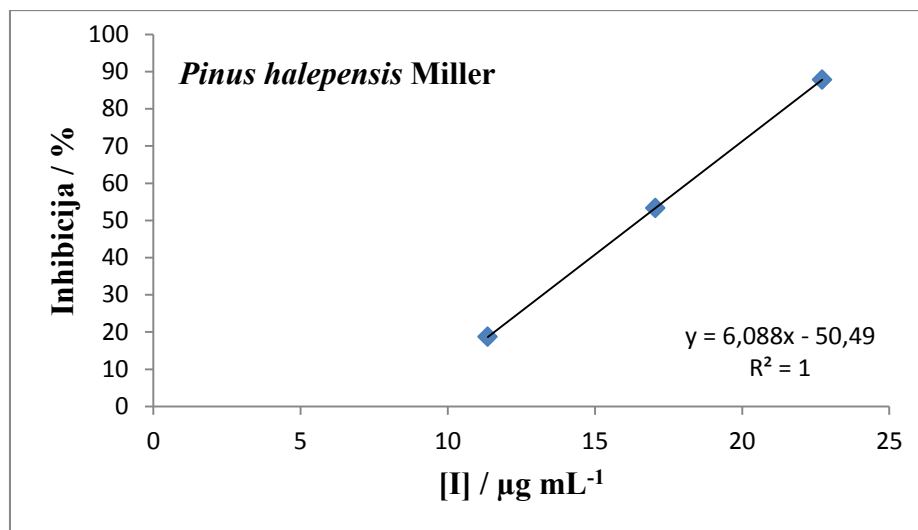
Tablica 12. Postotci inhibicije enzima acetilkolinesteraze za različite koncentracije i vrste uzoraka eteričnih ulja

[I] / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inhibicija / %		
	<i>C. sempervirens (horizontalis)</i>	<i>J. phoenicea</i>	<i>P. halepensis</i>
5,68	-	-	-
11,36	9,66	-	18,69
17,05	66,67	-	53,27
22,72	83,68	20,56	87,85

-- nema aktivnosti



Slika 58. Prikaz ovisnosti postotka inhibicije o koncentraciji eteričnog ulja čempresa (*C. sempervirens*), $IC_{50} = 16,53 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 59. Prikaz ovisnosti postotka inhibicije o koncentraciji eteričnog ulja alepskog bora (*P. halepensis*), $IC_{50} = 16,50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Brojnim istraživanjima utvrđeno je da pojedine biljne vrste, odnosno spojevi sadržani u njima posjeduju inhibicijsku aktivnost prema enzimu acetilkolinesterazi te bi se mogle primjenjivati kao potencijalni lijekovi za tretiranje Alzheimerove bolesti. Iz izračunatih podataka može se zaključiti da uzorci eteričnih ulja čempresa i alepskog bora pokazuju podjednako dobru sposobnost inhibicije enzima AChE. Povećanjem koncentracije inhibitora raste i postotak inhibicije. Maksimalna inhibicija AChE postignuta je pri koncentraciji $22,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ uzorka eteričnog ulja alepskog bora i iznosi 87,85 % dok je $IC_{50} = 16,53 \mu\text{g mL}^{-1}$ izračunata grafički. Eterično ulje čempresa pri istoj koncentraciji ima sličnu vrijednost - 83,68 % dok je $IC_{50} = 16,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ izračunat grafički. Najlošije rezultate pokazao je uzorak eteričnog ulja gluhača koji pri koncentracijama 5,68, 11,36 te $17,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ nema zabilježenu aktivnost, a pri koncentraciji $22,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ iznosi tek 20,56 %.

3.5. Sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze

Ispitana je sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze metodom po Ellmanu. Određen je postotak inhibicije za različite koncentracije uzoraka eteričnih ulja iz iglica čempresa, gluhača i alepskog bora. Rezultati inhibicijskog djelovanja različitih koncentracija uzorka na enzim butirilkolinesterazu prikazani su u tablici 13.

Tablica 13. Postotci inhibicije enzima butirilkolinesteraze za različite koncentracije i vrste uzoraka eteričnih ulja

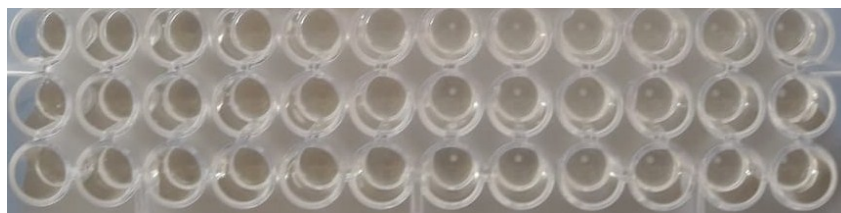
[I] / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inhibicija / %		
	<i>Cupressus sempervirens</i> L. (<i>horizontalis</i>)	<i>Juniperus phoenicea</i> L.	<i>Pinus halepensis</i> Miller
17,05	17,63	28,85	-
22,72	35,58	33,97	8,01

Iz navedenih podataka može se zaključiti da uzorci eteričnih ulja čempresa i gluhača pokazuju slične rezultate, dok su najslabiji rezultati zabilježeni kod uzorka eteričnog ulja alepskog bora. Povećanjem koncentracije inhibitora raste i postotak inhibicije. Maksimalna inhibicija BChE postignuta je pri koncentraciji 22,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ uzorka eteričnog ulja čempresa i iznosi 35,58 %. Eterično ulje gluhača pri istoj koncentraciji ima vrlo blisku vrijednost, a to je 33,97 %. Uzorak eteričnog ulja alepskog bora pri koncentraciji 17,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nema zabilježenu aktivnost, a pri koncentraciji 22,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ iznosi 8,01 %.

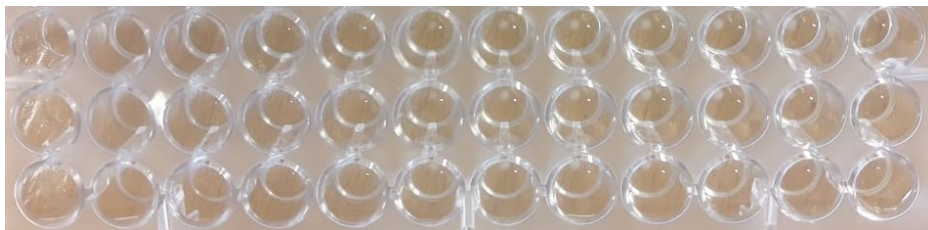
3.6. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja određena metodom disk difuzije

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

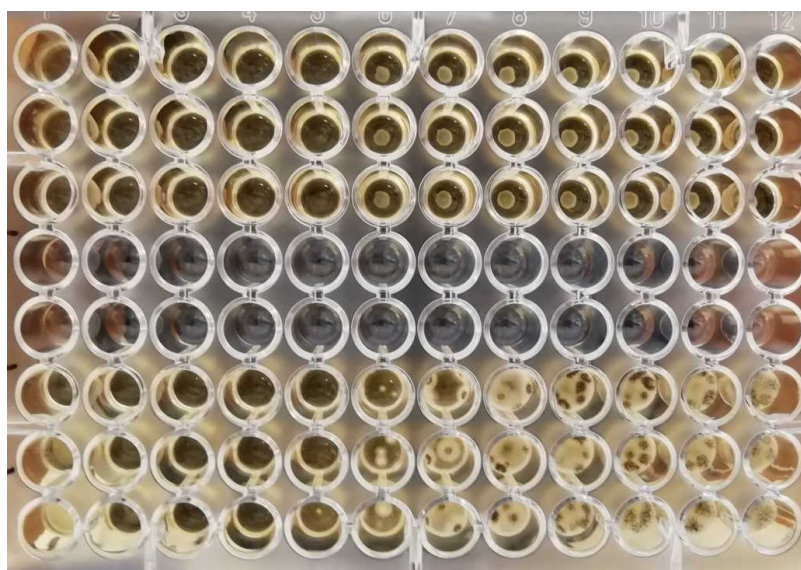
	<i>Cupressus sempervirens</i> L. (<i>horizontalis</i>)		<i>Juniperus phoenicea</i> L.		<i>Pinus halepensis</i> Miller	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
Gram-pozitivne bakterije						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	3363	6726	1831.1	3662.2	2119.5	2119.5
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	420.4	1681.5	457.8	1831.1	264.9	1059.7
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	420.4	1681.5	457.8	1831.1	1059.7	4239
<i>Bacillus cereus</i>	1681.5	3363	915.5	1831.1	529.8	1059.7
<i>Clostridium perfringens</i>	1681.5	> 6726	915.5	915.5	529.8	1059.7
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	420.4	840.75	457.8	457.8	132.5	264.9
<i>Micrococcus luteus</i>	3363	6726	1831.1	3662.2	1059.7	1059.7
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	420.4	1681.5	457.8	1831.1	264.9	1059.7
Gram-negativne bakterije						
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3363	3363	3662.2	3662.2	1059.7	1059.7
Gljivice	MIK₅₀	MIK₉₀	MIK₅₀	MIK₉₀	MIK₅₀	MIK₉₀
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	420.4	840.75	228.9	457.8	132.5	264.9
<i>Aspergillus niger</i>	52.5	210.2	57.2	228.9	33.1	132.5



Slika 60. Rezultati mikrodilucijskog testa eteričnog ulja čempresa na *E. faecalis*



Slika 61. Rezultati mikrodilucijskog testa eteričnog ulja gluhača na *S. aureus*



Slika 62. Rezultati mikrodilucijskog testa eteričnog ulja alepskog bora na *C. albicans* (gornji dio) i *A. niger* (donji dio)

Iz tablice 14. vidljivo je da eterična ulja iz iglica čempresa, gluhača i alepskog bora nemaju značajnije antimikrobno djelovanje prema većini sojeva mikroorganizama. Međutim, kad je riječ o antifungalnom djelovanju, sve tri vrste eteričnog ulja imaju vrlo dobre rezultate prema *A. niger*. MIK_{50} i MIK_{90} označavaju najmanju inhibicijsku koncentraciju, odnosno najnižu koncentraciju uzorka (eteričnog ulja) koja je potrebna da spriječi rast gljivica za 50 %, odnosno 90 %. Konkretno, eterično ulje alepskog bora ima najbolje rezultate ($MIK_{50} = 33,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $MIK_{90} = 132,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ostale dvije vrste eteričnih ulja imaju slične vrijednosti MIK_{50} , a one iznose $52,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ za eterično ulje čempresa i $57,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ za eterično ulje gluhača.

Antifungalna aktivnost na gljivicu *C. albicans* ATCC 90029 bila je slabija, a najbolji rezultat pokazalo je eterično ulje alepskog bora čiji MIK_{50} iznosi $132,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, a MIK_{90} $264,9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eterično ulje alepskog bora pokazalo je i najbolji rezultat MIK i MBK kad je riječ o bakterijama, konkretno na *L. monocytogenes* ATCC 19111, gdje MIK iznosi $132,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, a MBK $264,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ što su vrlo dobri rezultati. U znanstvenom članku (Abi-Ayad *et al.*, 2011)⁵² dobiveni su znatno bolji rezultati za antimikrobnu aktivnost protiv *S. aureus*, *B. cereus* i *E. coli*, međutim radi se o metodi disk difuzije (6 mm disk natopljen s 10 μL eteričnog ulja) koja se uvelike razlikuje od metode mikrodilucije. Naime, metoda mikrodilucije koja je korištena u ovom radu je preciznija jer daje minimalnu koncentraciju pri kojoj eterično ulje inhibira rast bakterija (MIK) te minimalnu koncentraciju pri kojoj eterično ulje ubija bakterije (MBK). Kod metode disk difuzije mjeri se zona inhibicije za testiranu koncentraciju te se ne zna koja je koncentracija pri kojoj ulje počinje svoje djelovanje.

Eterično ulje gluhača ima najnižu MIK vrijednost za sljedeće bakterije: *S. pyogenes* ATCC 19615, *E. faecalis* ATCC 29212, *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *S. pneumoniae* te je za sve od navedenih vrijednost jednaka $MIK = 457,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, ali MBK vrijednosti se uvelike razlikuju. Najmanja vrijednost MBK ove vrste eteričnog ulja jest $457,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ i to u slučaju *L. monocytogenes* ATCC 19111. U znanstvenom članku (Bachir Raho *et al.*, 2017)⁵³ također je pokazano da eterično ulje gluhača nema antimikrobnu aktivnost protiv *E. coli*, dok su rezultati protiv *S. aureus* bolji ($MIK = 62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $MBK = 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) nego u ovom radu ($MIK = 1831,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $MBK = 3662,2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Rezultati eteričnog ulja čempresa slični su kao kod eteričnog ulja gluhača. Najniža MIK vrijednost ponavlja se kod istih sojeva bakterija, samo što je u ovom slučaju malo manji iznos, $MIK = 420,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. MBK vrijednosti se razlikuju, a

najmanja je 840,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i to ponovno kod *L. monocytogenes* ATCC 19111. U znanstvenom članku (Selim *et. al.*, 2014)⁴⁸ određena je antimikrobna aktivnost eteričnog ulja čempresa metodom disk difuzije koja je ipak manje preciznija od metode mikrodilucije. Antimikrobna aktivnost u članku protiv *S. aureus* bila je mnogo veća (MIK = 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, MBK = 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) od antimikrobne aktivnosti u ovom radu (MIK = 3363 $\mu\text{g mL}^{-1}$, MBK = 6726 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Međutim, u članku nije bilo moguće odrediti MIK i MBK za bakterije *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. coli* te gljivicu *C. albicans* za razliku od ovog rada gdje su uspješno određene sve MIK i MBK vrijednosti: *B. cereus* (MIK = 1681,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i MBK = 3363 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *E. faecalis* (MIK = 420,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i MBK = 1681,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *E. coli* (MIK = 3363 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i MBK = 3363 $\mu\text{g mL}^{-1}$) te *C. albicans* (MIK₅₀ = 420,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i MIK₉₀ = 840,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Treba napomenuti da je u članku najveća korištena koncentracija eteričnog ulja čempresa 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a u ovom radu 13452 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tako da su nepoklapanja u rezultatima i za očekivati.

Antimikrobna aktivnost na gram-negativnu bakteriju *E. coli* ATCC 25922 bila je naslabija što je bilo i za očekivati jer su gram-negativne bakterije rezistentnije od gram-pozitivnih, zato je i testiran samo jedan predstavnik ove vrste bakterije. Ipak, eterično ulje alepskog bora ima skoro trostruko nižu MIK vrijednost od ostale dvije vrste, a ona iznosi 1059,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Vrijednost MBK poklapa se sa MIK vrijednosti. Najlošiji rezultat zabilježen je kod eteričnog ulja čempresa, a iznosi 3662,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ te se također poklapaju MIK i MBK vrijednosti.

4. ZAKLJUČCI

Eterična ulja iz iglica čempresa, gluhača i alepskog bora izolirana su metodom vodene destilacije po Clevengeru te se može zaključiti sljedeće:

- Kemijski sastav eteričnih ulja određen je vezanim sustavom GC-MS. Najzastupljeniji spoj kod eteričnih ulja čempresa i gluhača bio je monoterpen α -pinen (32,75 % i 61,34 %), a kod alepskog bora diterpen kaur-16-en (16,77 %).
- Klase spojeva i njihov međusobni udio u eteričnim uljima: čempres (84,04 % monoterpenoida, 4,14 % seskviterpenoida te 8,35 % diterpenoida), gluhač (78,06 % monoterpenoida te 17,11 % seskviterpenoida) i alepski bor (44,75 % monoterpenoida, 16,90 % seskviterpenoida te 32,82 % diterpenoida).
- Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja ispitana metodama FRAP i DPPH pokazala da eterična ulja nemaju značajniju aktivnost. Najbolji rezultat kod FRAP metode pokazalo je eterično ulje alepskog bora koncentracije $21,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1,5 \mu\text{mol}$ ekvivalenta $\text{Fe}^{\text{II}} / \text{L}$), dok je eterično ulje čempresa koncentracije $22,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazalo najbolji rezultat kod DPPH metode (6,42 %).
- Inhibicijska sposobnost eteričnog ulja na enzim acetilkolinesterazu ispitana je metodom po Ellmanu. Povećanjem koncentracije eteričnog ulja povećava se i postotak inhibicije. Maksimalna inhibicija postignuta je pri koncentraciji $22,72 \text{ mg mL}^{-1}$ uzorka eteričnog ulja alepskog bora i iznosi 87,85 %.
- Inhibicijska sposobnost eteričnog ulja na enzim butirilkolinesterazu ispitana je također metodom po Ellmanu. Maksimalna inhibicija postignuta je pri koncentraciji $22,72 \text{ mg mL}^{-1}$ uzorka eteričnog ulja čempresa i iznosi 35,58 %.
- Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja ispitana je metodom mikrodilucije. Najveću aktivnost imalo je eterično ulje alepskog bora i to na *Listeria monocytogenes* (MIK = $132,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) te na gljivicu *Aspergillus niger* (MIK₅₀ = $33,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, MIK₉₀ = $132,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

5. LITERATURA

1. URL:<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77126767-1#children> (24.5.2019.), Kewscience, Plants of the World online
2. URL:<https://www.plantea.com.hr/cempres/> (24.5.2019.)
3. URL:<https://www.mediteranka.com/index.php/hr/katalog/ukrasni-grmovi-i-stabla/item/170-cempres> (24.5.2019.)
4. URL:<https://www.plantea.com.hr/gluhac/> (24.5.2019.)
5. M. Ramdani, T. Lograda, H. Silini, A. Zeraib, P. Chalard, G. Figueredo, M. Bouchaala, S. Zerrar, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **11** (2013), 22-28.
6. K. Alzand, *Phytochemical Investigation of the Flavonoids*, Lap Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, 2012., s.67.
7. URL:<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:328247-2> (24.5.2019.), Kewscience, Plants of the World online
8. URL:<https://www.plantea.com.hr/alepski-bor/> (24.5.2019.)
9. URL:<http://www.cvijet.info/images/galleries/640-480/414c3c5a-Pinus%20halepensis%20%C4%8Dp.jpg>: (24.5.2019.)
10. I. Jerković, I. Blažević, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja*, Nerecenzirana interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.
11. V. Petrović, *Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda Artemisia L. plinskom kromatografijom*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
12. T. Vogt, *Mol. Plant.*, **3** (2010), 2-20.
13. A. Radonić, *Prirodni organski spojevi*, Nerecenzirana predavanja, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.
14. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2009.
15. I. Blažević, *Metode izolacije i koncentracije eteričnih ulja*, Nerecenzirana predavanja, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2018.
16. A. Prkić, *Predavanja iz Analitičke kemije*, Nerecenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016.
17. I. Blažević, *Predavanja iz Organske kemije*, Nerecenzirana predavanja, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.

18. URL:<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7785708&Mask=200> (26.5.2019.), NIST Chemistry WebBook
19. A. Radonić, Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smrike (*Juniperus oxycedrus* L.), Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2000.
20. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, Antioxidants in nutrition, health, and disease, Oxford University Press, New York, USA, 1995., s.1-160.
21. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Rad. Biol. Med.*, **3** (1999), 1-25.
22. URL:<http://vemmaseminar.weebly.com/vemma.html> (26.5.2019.)
23. I. Generalić, Fenolni profil, antioksidacijski i antimikrobni potencijal odabranoga ljekovitoga bilja mediteranskoga podneblja, Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2011.
24. B. Vrhovac, I. Francetić, B. Jakšić, B. Labar, B. Vucelić, Interna medicina, Ljevak, Zagreb, 2003., s.167-241.
25. A. Buljan, Ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE i određivanje antioksidacijske aktivnosti eteričnog ulja gorske metvice (*Calamintha nepetoides* Jord.), Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.
26. R. Amorati, L. Valgimigli, *Free Rad. Res.*, **5** (2015), 633-649.
27. A. Karadag, B. Ozeelik, S. Saner, *Food Anal. Met.*, **2** (2009), 41-60.
28. F. Abdellah, B. Laid, S. M. Hammoudi, R. Benaraba, *Int. J. Innov. Eng. Sci. Res.*, **6** (2018), 66-76.
29. O. Politeo, Biokemijski praktikum, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2012.
30. D. Huang, B. Ou, R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, **53** (2005), 1841-1856.
31. F. Burčul, Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2014.
32. URL:<http://www.medicinskileksikon.info/znacenje/acetilkolinesteraza.html> (29.5.2019.)
33. G. Kryger, M. Harel, K. Giles, L. Toker, B. Velan, A. Lazar, C. Kronman, D. Barak, N. Ariel, A. Shafferman, I. Silman, J. L. Sussman, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **56** (2000), 1385-1394.
34. M. Macan, Utjecaj antilipidnih lijekova na esteraze, lipide i leptin u biološkom materijalu štakora, Disertacija, Zagreb, 2011.

35. E. Giacobini, *Pharmacol. Res.*, **50** (2004), 433-440.
36. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, *J. Biol. Chem.*, **278** (2003), 41141-41147.
37. S. M. Nabavi, A. Marchese, M. Izadi, V. Curti, M. Daglia, S. F. Nabavi, *Food Chem.*, **173** (2015), 339-347.
38. C. F. Carson, T. V. Riley, *Lett. Appl. Microb.*, **16** (1993), 49-55.
39. D. Božinović, Antimikrobni lijekovi, Medicinska bakteriologija i mikologija, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.
40. S. Kalenić, E. Mlinarić-Missoni, Medicinska bakteriologija i mikologija, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.
41. URL:https://classconnection.s3.amazonaws.com/229/flashcards/3132229/jpg/s_aureus_large-141059023C47A2FF31A.jpg (17.6.2019.)
42. URL:<https://paramedicsworld.com/escherichia-coli/morphology-culture-characteristics-of-escherichia-coli/medical-paramedical-studynotes> (17.6.2019.)
43. URL:<https://drfungus.org/knowledge-base/candida-species/> (17.6.2019.)
44. URL:https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=820AE14881E43109ED473FF91344DA1E?sequence=1 (17.6.2019.), World Health Organisation (WHO): Antimicrobial resistance, Global Report on Surveillance
45. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S.
46. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa
47. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
48. S. A. Selim, A. E. Mohammed, S. M. Hassan, A. R. Abdulrhman, *BMC Complement. Altern. M.*, **14** (2014), 1-8.
49. Ali A. M., El – Sawi S. A., Motawae H. M., *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **4** (2007), 417-426.
50. K. Mazari, N. Bendimerad, C. Bekhechi, X. Fernandez, *J. Med. Plant Res.*, **4** (2010), 959-964.
51. M. Abi Ayad, F. Z. Abi Ayad, H. A. Lazzouni, S. A. Rebiahi, C. Ziani Cherif, Bessiere, *J. Med. Plant Res.*, **5** (2011), 5433-5436.

52. M. Abi Ayad, F. Z. Abi Ayad, H. A. Lazzouni, S. A. Rebiahi, *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, **1** (2011), 33-36.
53. G. Bachir Raho, M. Otsmane, F. Sebaa, *J. Med. Bot.*, **1** (2017), 1-7.