

# Ekstrakcija eteričnih ulja iz borovih iglica

---

Opačak, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:032397>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Opačak

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2020.

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

Kandidatkinja Andrea Opačak

Predala je izrađen završni rad dana: 18. rujna 2020.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 23. rujna 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Opačak

**EKSTRAKCIJA ETERIČNIH ULJA IZ BOROVIH IGLICA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Aleksandra Sander

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

doc. dr. sc. Maja Bival Štefan

Zagreb, rujan 2020.

*Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Aleksandri Sander na pomoći i vodstvu tijekom izrade ovog rada.*

*Također, zahvaljujem se doc. dr. sc. Maja Bival Štefan, doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić i mag. ing. cheming. Ani Petračić na pomoći i trudu pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi uvijek bili najveća podrška.*

## SAŽETAK

Ekstrakcija eteričnog ulja jedan je od najstarijih načina recikliranja biljne biomase pri čemu se iglice koriste kao vrijedna sirovina te se time smanjuje količina biootpada. Sastav eteričnog ulja uvelike ovisi o vrsti biljnog materijala, a za potrebe ovog istraživanja korišteni su crni bor, obična smreka, srebrna ili bodljikava smreka te Pančičeva omorika.

Ispitivao se kemijski sastav i mikrobiološka aktivnost uzoraka eteričnih ulja dobivenih metodom hidrodestilacije po Clevengeru i Soxhlet ekstrakcijom. Kemijski sastav analiziran je tankoslojnom kromatografijom, plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom. Glavne komponente eteričnog ulja crnog bora (*Pinus nigra*) su  $\alpha$ -pinen (34,16%) i germakaren D (29,79%). Analizom eteričnih ulja dobivenih hidrodestilacijom iglica smreke (*Picea pungens*, *Picea abies* i *Picea omorika*) uočena je velika sličnost u kemijskom sastavu pri čemu je dominantna sastavnica u sva tri ispitivana uzorka bornil-acetat u udjelima između 21,97 i 53,19%. Antimikrobno djelovanje testirano je prema Gram-negativnoj i Gram-pozitivnoj bakterijskoj kulturi te kvascu roda *Candida*. Intenzitet inhibirajućeg utjecaja eteričnih ulja razlikovao se ovisno o korištenoj mikrobnjoj kulturi.

**Ključne riječi:** eterično ulje, hidrodestilacija, *Picea abies*, *Picea omorika*, *Picea pungens*, *Pinus nigra*

## ABSTRACT

Extraction of essential oil is one of the oldest methods of recycling plant biomass, using pine needles as a valuable raw material and thus reducing the amount of biowaste. The composition of essential oil mainly depends on the type of plant material. In the present study, Black Pine, Norway Spruce, Blue Spruce and Pančić Spruce (Serbian spruce) were used.

The chemical composition and microbiological activity of essential oils extracted by the method of hydrodistillation by Clevenger and Soxhlet extraction were researched. The chemical composition was analyzed by thin layer chromatography, gas chromatography with mass spectrometry and infrared spectroscopy with Fourier transform. The main components of Black Pine (*Pinus nigra*) essential oil are  $\alpha$ -pinene (34.16%) and germacaren D (29.79%). The analysis of essential oils extracted by hydrodistillation of Spruce needles (*Picea pungens*, *Picea abies* and *Picea omorika*) showed great similarity in chemical composition between those three species. Dominant component in all three samples was bornyl acetate in concentrations from 21.97 to 53.19 percent. The antimicrobial activity was tested against Gram-negative and Gram-positive bacterial cultures and yeast of the genus *Candida*. The intensity of the inhibitory effect of the essential oils used varied depending on the microbial culture used.

**Keywords:** essential oil, hydrodistillation , *Picea abies*, *Picea omorika*, *Picea pungens*  
*Pinus nigra*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Uzgoj ljekovitog bilja.....	2
2.2. Eterična ulja .....	2
2.3. Dobivanje eteričnog ulja .....	3
2.3.1. Destilacija vodenom parom.....	3
2.3.2. Hidrodestilacija .....	4
2.3.3. Vodeno - parna destilacija.....	5
2.3.4. Ekstrakcija organskim otapalima .....	5
2.3.5. Ekstrakcija superkritičnim fluidima.....	6
2.3.6. Maceracija .....	6
2.3.7. Hladno prešanje.....	7
2.4. Skladištenje eteričnog ulja .....	8
2.5. Mikrobiološka analiza eteričnog ulja .....	8
2.6. Aromatična biljna porodica <i>Pinaceae</i> .....	10
2.6.1. Crni bor ( <i>Pinus nigra</i> ).....	11
2.6.2. Obična smreka ( <i>Picea abies</i> ) .....	12
2.6.3. Srebrna ili bodljikava smreka ( <i>Picea pungens</i> ) .....	12
2.6.4. Pančičeva omorika ( <i>Picea omorika</i> ) .....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	14
3.1. Cilj rada.....	14
3.2. Biljni materijal .....	14
3.3. Izolacija eteričnog ulja .....	14
3.3.1. Hidrodestilacija .....	14
3.3.2. Soxhlet ekstrakcija .....	15
3.4. Plinska kromatografija vezana sa spektrometrom masa (GC-MS) .....	16
3.5. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR).....	17
3.6. Tankoslojnakromatografija (TLC) .....	18
3.7. Mikrobiološka analiza.....	18
3.7.1. Bakterijske kulture .....	18
3.7.2. Priprema hranjive podloge .....	18
3.7.3. Priprava suspenzija bakterija.....	18
3.7.4. Određivanje prijenosa antimikrobnih sastojaka–difuzijski test .....	19



4. REZULTATI I RASPRAVA .....	20
4.1. Prinos eteričnog ulja.....	20
4.2. Kemijski sastav eteričnog ulja .....	21
4.2.1. Tankoslojna kromatografija .....	21
4.1.2. Plinska kromatografija vezana sa spektrometrom masa.....	22
4.2.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR).....	26
4.3. Mikrobiološka analiza .....	28
ZAKLJUČAK .....	31
Literatura .....	32

## 1.UVOD

Eterična ulja su hlapljivi organski kompleksi koji mogu sadržavati više od sto različitih spojeva, a nalaze se u uljnim žlijezdama biljaka koje mogu biti površinske ili unutrašnje. Trenutno je poznato oko 3000 vrsta eteričnih ulja od kojih oko 300 ima značajnu komercijalnu ulogu [1]. Koriste se kao dodaci hrani, kozmetici, parfemima, farmaceutskim sredstvima, sredstvima za čišćenje i poljoprivrednim proizvodima.

Prva sustavna ispitivanja sastavnica eteričnih ulja proveo je M. J. Dumas koji je, u radu objavljenom 1833. godine, predstavio rezultate analiza spojeva koji su sadržavali ugljikovodike, kisik, sumpor i dušik. Najznačajnija istraživanja proveo je O. Wallach koji je ustanovio da je nekoliko terpena kemijski identično, iako su im dodijeljeni različiti nazivi. Stoga je pokušao izolirati pojedine sastojke eteričnih ulja frakcijskom destilacijom i proučiti njihova osnovna svojstva [2].

Stabla četinjača smatraju se izvorom bioaktivnih spojeva koji su dali važan doprinos u otkriću mnogih farmaceutskih proizvoda te su stoga mnoge vrste podvrgnute opsežnim fitokemijskim istraživanjima. Nekoliko bioaktivnih spojeva izoliranih iz različitih vrsta roda *Pinus* imaju različite biološke učinke poput protuupalnih, antioksidativnih i antimutagenih. Neke se vrste često koriste zbog svojih ljekovitih učinaka kao diuretici, za liječenje plućnih i mokraćnih poremećaja, a najčešće pri liječenju respiratornih tegoba. Zbog svog svježeg mirisa često se mogu naći u sastavu osvježivača zraka, sapuna i deterdženata.

U posljednjih nekoliko godina uočava se porast otpornosti mikroorganizama na postojeće antibiotike te je sve veće zanimanje za primjenu biljnih proizvoda kao potencijalnih i perspektivnih izvora antimikrobnih sredstava. Dokazano je da eterična ulja roda *Pinus* posjeduju antibakterijska i antifungalna svojstva te mogu poslužiti kao izvor antimikrobnih sredstava [3].

Cilj ovog rada bio je izolirati eterična ulja porodice Pinaceae. Nakon izolacije provedena je karakterizacija uzoraka tankoslojnom kromatografijom, plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom. Antimikrobni utjecaj eteričnih ulja ispitivao se disk-difuzijskim testom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Uzgoj ljekovitog bilja

Kemijski sastav i kvaliteta eteričnog ulja uvelike ovisi o načinu na koji biljke rastu ili se uzgajaju. Biljke koje možemo pronaći na tržištu najčešće imaju ovakve oznake uzgoja i rasta [4]:

**1. Divlji (samonikli) rast** – ovakav način rasta je najbolji jer se biljka sama u potpunosti prilagodi okolišu i proizvodi one tvari koje su joj nužne za opstanak u ekosustavu. Prednost ovakvog rasta je iznimna kvaliteta eteričnog ulja jer uzgojene biljke ponekad daju ulja slabije kvalitete, ali nekontroliranim branjem mogu se uništiti biljne vrste te time ugroziti ekosustav. Također, korištenjem biljke s oznakom divljeg rasta ne možemo utvrditi radi li se o staništima koja su udaljena od onečišćenja, kanalizacije, cesta i industrije.

**2. Certificirani biološki divlji rast** – također vrsta divljeg rasta, no takvo stanište nadziru posebne komisije koje utvrđuju radi li se o ekološki prihvatljivom zemljištu za branje koje se ne nalazi u onečišćenom području.

**3. Konvencionalni uzgoj** – na zemljištu se uzgaja samo jedna vrsta, a koriste se umjetna gnojiva, pesticidi i herbicidi. Najvažnije je da uzgajivači poštuju doba karence (period između zaprašivanja i branja) kako biljke ne bi sadržavale opasne insekticide.

**4. Biološki uzgoj** – vrsta uzgoja u monokulturama, kao i konvencionalni uzgoj, ali bez umjetnih gnojiva i insekticida. Zemljišta za uzgoj ne smiju biti u blizini onečišćenja, a posebne komisije nadziru kvalitetu uzgoja.

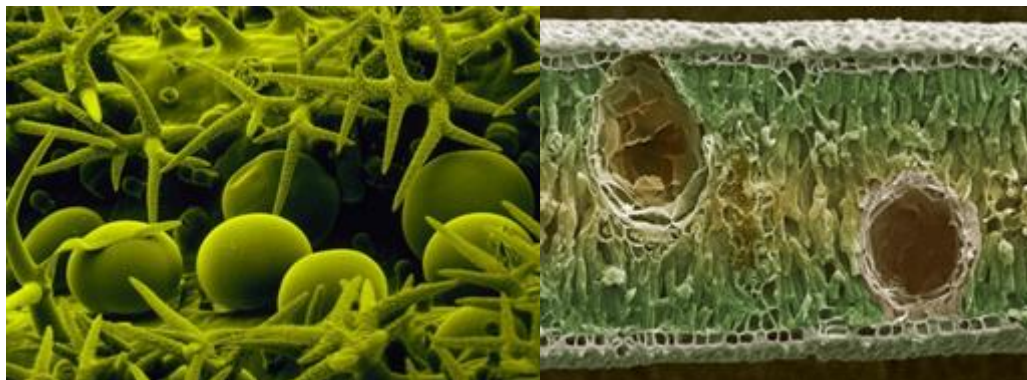
**5. Biodinamički uzgoj** – jedan od najtežih uzgoja jer se pokušava imitirati divlji rast, ali tako uzgojene biljke daju vrlo kvalitetno ulje.

### 2.2. Eterična ulja

Eterična ulja su hlapljivi organski kompleksi koji mogu sadržavati više od sto različitih spojeva. Sintetiziraju se kao sekundarni metaboliti dijelova biljke kao što su cvijeće, lišće, plodovi, sjemenke, korijenje, rizomi i stabljike [1]. Kemijski sastav ulja ovisi o biljci iz koje su dobiveni, godišnjem dobu, zemljopisnom položaju, tehnici žetve, vrsti tla te genotipu [1].

Poznato je da imaju široku primjenu u industriji, a koriste se kao: dodatci prehrani, kozmetici, parfemima, lijekovima te poljoprivrednim proizvodima [1].

Eterična se ulja nalaze u uljnim žlijezdama koje mogu biti površinske ili unutrašnje, **slika 1.**



**Slika 1.** Površinska (cvijet lavande) [5] i unutrašnja uljna žlijezda [6].

### 2.3. Dobivanje eteričnog ulja

Ekstrakcija eteričnog ulja je jedan od najstarijih načina recikliranja biljne biomase, ali je vrlo malo informacija o procesu ekstrakcije iz biomase koja sadrži mali postotak eteričnog ulja, kao što su *Pinus sylvestris* i *Picea abies* [4]. Eterična ulja su dobivena iz biljnih materijala različitim metodama koje su prilagođene ovisno o tome iz kojeg se biljnog dijela dobiva ulje [7]. Najčešće korišene metode za dobivanje eteričnog ulja su [7]:

#### 2.3.1. Destilacija vodenom parom

#### 2.3.2. Hidrodestilacija

#### 2.3.3. Vodeno-parna destilacija

#### 2.3.4. Ekstrakcija organskim otapalima

#### 2.3.5. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

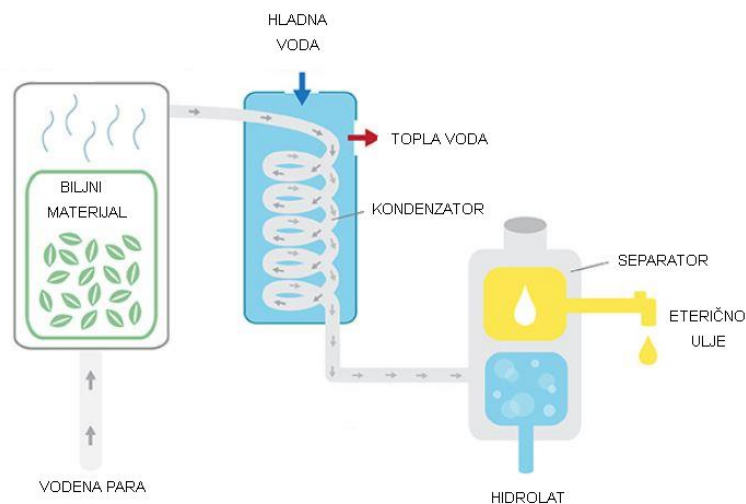
#### 2.3.6. Maceracija

#### 2.3.7. Hladno prešanje

#### 2.3.1. Destilacija vodenom parom

Destilacija vodenom parom je najčešće korištena metoda za ekstrakciju eteričnih ulja iz biljnog materijala. Eterična ulja su smjese spojeva koje su sadržane u žlijezdama biljke.

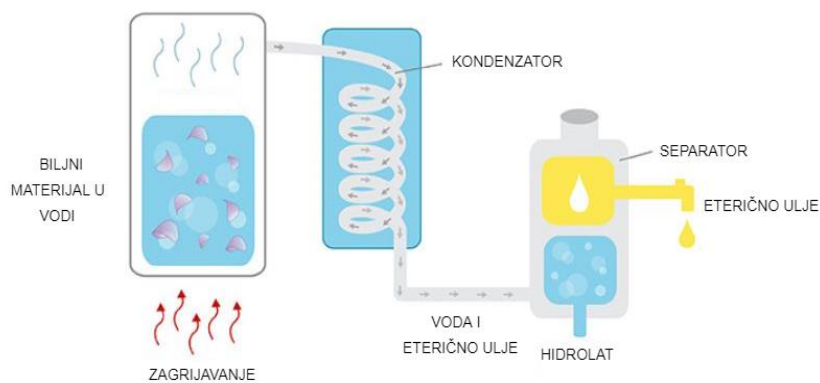
Mnogi od tih spojeva imaju vrlo visoka vrelišta, između 150 i 200°C te bi za njihovu izolaciju bilo potrebno zagrijavati biljke na tu temperaturu. Umjesto destilacije biljke na tako visokim temperaturama, kroz biljnu masu se propušta vruća vodena para. Vodena para prolazi kroz biljni materijal te pri tome oslobađa aromatske molekule. Nakon isparavanja dolazi do kondenzacije biljnih spojeva u kondenzatoru. Dobivena kapljevina ispušta se iz kondenzatora te se odvodi u separator gdje se, zbog različite gustoće, odvajaju uljna i vodena faza. Uljna faza je lakša pa se nalazi na površini, a ispod se nalazi vodena faza koja se naziva hidrolat ili cvjetna voda. Destilacija vodenom parom je složen proces pri kojem je potrebno voditi računa o kvaliteti biljnog materijala, temperaturi, tlaku, trajanju destilacije te načinu odvajanja eteričnog ulja i hidrolata.



**Slika 2.** Shematski prikaz procesa destilacije vodenom parom [7].

### 2.3.2. Hidrodestilacija

Hidrodestilacija je najpogodnija metoda ako se za dobivanje eteričnog ulja koristi krhki biljni materijal, poput ružinih latica. Biljni materijal stavlja se u vodu i zagrijava do vrenja pri čemu dolazi do isparavanja hlapivih biljnih komponenata zajedno s vodom. Nakon isparavanja dolazi do kondenzacije u kondenzatoru, a kapljevine se zatim odvajaju u separatoru. Prednost ove metode je u tome što se produkti međusobno ne miješaju pa ih je moguće odvojiti dekantiranjem. Dobivena vodena faza ima nekoliko imena: hidrolat, hidrosol, biljna voda, esencijalna voda, cvjetna voda ili biljni destilat [7].



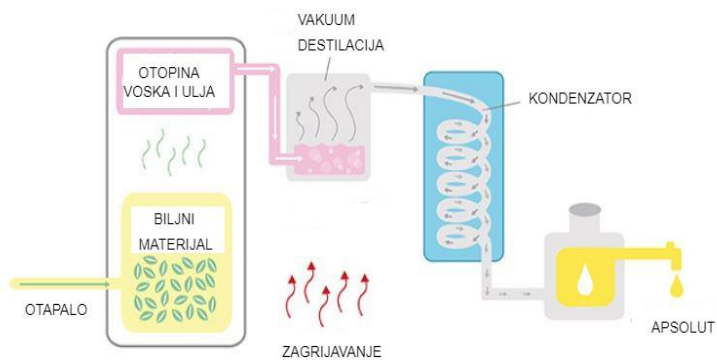
**Slika 3.** Shematski prikaz procesa hidrodestilacije [7].

### 2.3.3. Vodeno - parna destilacija

Ova metoda se razlikuje od prethodne po tome što se biljni materijal nalazi u vodi unutar spremnika koji se zagrijava, a vodena para se uvodi izvana.

### 2.3.4. Ekstrakcija organskim otapalima

Organska otapala, kao što su *n*-heksan i etanol, koriste se za izoliranje eteričnih ulja iz biljnog materijala. Mirisne tvari ekstrahiraju se iz organskog otapala u alkohol, koji se nakon toga uklanja destilacijom, a tvar koja ostaje naziva se apsolut [4]. Ova metoda je najprikladnija za biljke koje daju niske prinose eteričnog ulja, a glavni nedostatak je to što je dobiveno ulje drugačijeg sastava od onog dobivenog hidrodestilacijom. Osim eteričnog ulja, često dolazi i do ekstrakcije pigmenata i smola pa dobiveni produkt zahtjeva dodatno pročišćavanje.



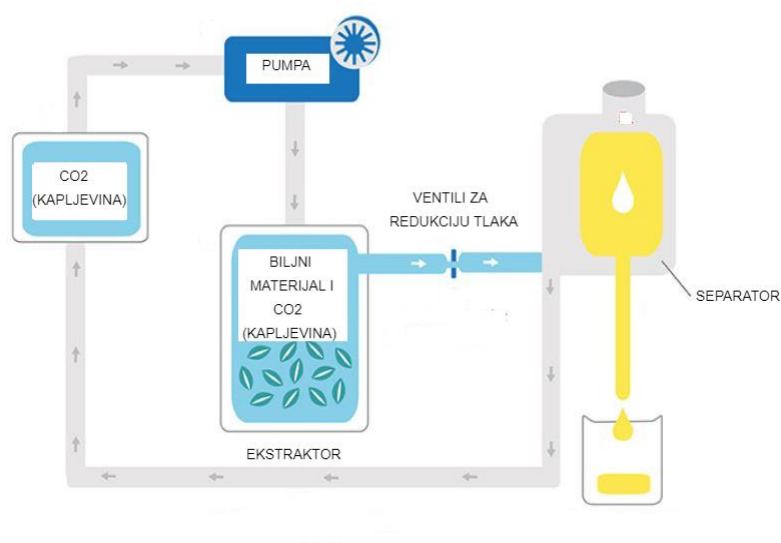
**Slika 4.** Shematski prikaz procesa ekstrakcije organskim otapalima [7]

### 2.3.5. Ekstrakcija superkričnim fluidima

Ekstrakcija superkričnim fluidima je skuplji i tehnološki zahtjevniji proces, a fluid koji se najčešće primjenjuje je ugljikov dioksid. Kao produkt nastaju ulja vrlo visoke kvalitete čiji sastav nije promijenjen primjenom visokih temperatura, za razliku od postupka destilacije vodenom parom. Ekstrakcija superkričnim ugljikovim dioksidom provodi se pri temperaturama između 35 i 38 °C, a destilacija vodenom parom provodi se između 60 i 100 °C [7]. Postupak se može opisati u nekoliko koraka (**slika 5.**):

1. Superkrični CO<sub>2</sub> se pumpa u komoru u kojoj se nalazi biljni materijal.
2. Ugljikov dioksid djeluje kao otapalo u kojem se otapaju sastavnice eteričnog ulja.
3. Pri povratku na atmosferski tlak, CO<sub>2</sub> ponovno prelazi u plinovito stanje, a ulje se odvaja u separatoru.

Prednost ekstrakcije superkričnim ugljikovim dioksidom je ta što se ne koriste štetna otapala, a ugljikov dioksid se može lako ukloniti iz komore za ekstrakciju.

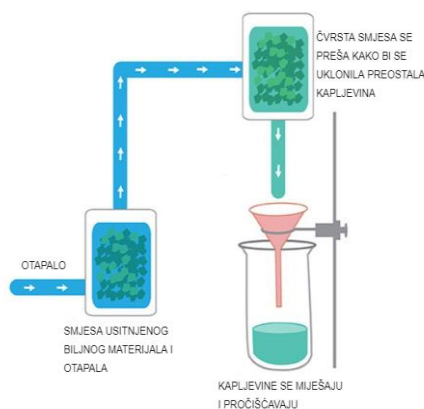


**Slika 5.** Shematski prikaz procesa ekstrakcije superkričnim CO<sub>2</sub> [7].

### 2.3.6. Maceracija

Maceracija je postupak ekstrakcije djelotvornih tvari iz usitnjenog biljnog materijala pri sobnoj temperaturi. Prije samog procesa potrebno je dobro osušiti biljni materijal kako bi se suzbio rast mikroba. Osušena biljka se sitno reže, drobi ili melje u prah te stavlja u zatvorenu posudu. Usitnjeni biljni materijal se prelije otapalom, a dobivena smjesa se ostavi da odstoji

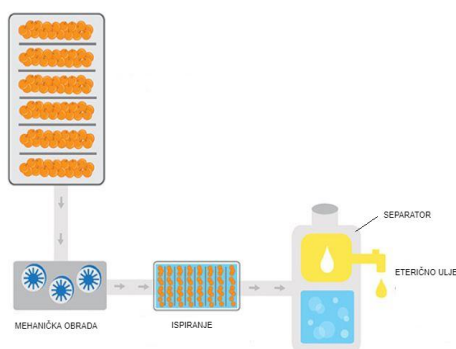
tjedan dana uz povremeno miješanje. Iscrpljeni biljni materijal se odvaja od otapala koje se ostavi još nekoliko dana na hladnom mjestu kako bi se izbistrilo, a nakon toga se filtrira. Dobiveni macerat je potrebno čuvati na hladnom i suhom mjestu u hermetički zatvorenoj posudi. Vrijeme i vrsta otapala ovise o vrsti biljnog materijala koji se koristi. Tako se za maceraciju korijena sljeza (*Althea officinalis*) koristi mlaka voda, a postupak traje dva do tri sata, dok se za gospinu travu (*Hypericum perforatum*) koriste masna ulja te postupak može trajati i do nekoliko tjedana [4].



**Slika 6.** Shematski prikaz procesa maceracije [7].

### 2.3.7. Hladno prešanje

Hladno prešanje se često koristi za dobivanje eteričnog ulja iz biljaka roda *Citrus*. Mehanička obrada biljnog materijala provodi se pri sobnoj temperaturi, a dobiveni produkt se sakuplja u sakupljaču. Centrifugiranjem se odvaja zaostali sadržaj krute tvari, a zatim u separatoru dolazi do odvajanja uljne i vodene faze.



**Slika 7.** Shematski prikaz procesa hladnog prešanja [7].



## 2.4. Skladištenje eteričnog ulja

Za očuvanje kvalitete eteričnih ulja bitno je voditi računa o [8]:

1. **Kontaktom materijalu posude** u kojoj se čuva – nekad su se eterična ulja čuvala u bakrenim posudama koje su bile presvučene kositrom, no danas je bakar zbog visoke cijene zamijenjen nehrđajućim čelikom ili aluminijem. Materijal od kojeg je napravljena posuda mora biti inertan i ne smije reagirati s molekulama eteričnog ulja.
2. **Temperaturi skladištenja** – preporučena temperatura skladištenja je 15 – 20 °C. Ukoliko je temperatura skladištenja niža od preporučene, a posuda nije do kraja napunjena, može doći do kondenzacije vode u spremniku te time do onečišćenja dobivenog produkta.
3. **Zaštiti od kisika** – atmosferski kisik spontano oksidira eterična ulja, a posebno ulja bogata ugljikovodicima kao što su citrusna ulja te ulja četinjača. Oksidirana ulja mogu izazvati alergijske reakcije, a kako do toga ne bi došlo, posude se pune eteričnim uljem do vrha pa u posudi nema dovoljno kisika za izraženiji proces oksidacije.

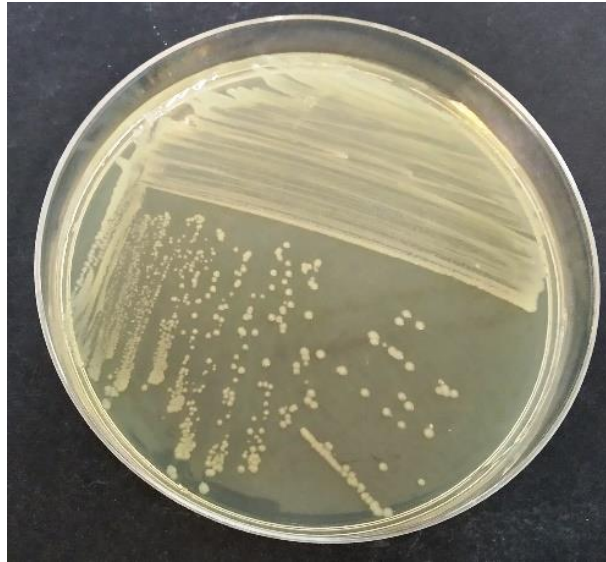
## 2.5. Mikrobiološka analiza eteričnog ulja

Bakterijska rezistencija na postojeće antibiotike te pad razvoja novih antibiotika predstavlja značajnu prijetnju ljudskom zdravlju te je stoga sve veća potreba za novim, učinkovitim i sigurnim antimikrobnim sredstvima. U posljednjih nekoliko godina raste primjena biljnih proizvoda kao antimikrobnih sredstava za prevenciju i liječenje zaraznih bolesti. Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti koristi se u otkrivanju lijekova, epidemiologiji te za predviđanje ishoda liječenja [9].

U ovom radu ispitivala se antimikrobna osjetljivost dobivenih uzoraka eteričnog ulja disk-difuzijskim testom, a korištene su bakterijske kulture *Escherichia coli* (3001) i *Bacillus subtilis* (3020) te kvasac *Candida lipolytica* (59), koji su izolirani iz okoliša.

*E. coli* (slika 8) iz porodice Enterobacteriaceae je Gram-negativni štapić koji raste na jednostavnim kulturama s minimalnim hranjivim tvarima. Može rasti u aerobnim, ali i u anaerobnim uvjetima te biti pokretljiva ili nepokretljiva. Zauzima posebno mjesto u mikrobiološkom svijetu jer izaziva teške infekcije u ljudskom i životinjskom organizmu. Uzrokuje sepsu, neonatalni meningitis, gastroenteritis te je najčešći uzročnik infekcija

mokraćnog sustava. Bakterijske infekcije liječe se antibioticima, a njihova pretjerana upotreba dovela je do značajnog porasta otpornosti, posebno na lijekove poput aminopenicilina i kotrimoksazola, koji su se u prošlosti često koristili. Porast antimikrobne rezistencije *E. coli* smatra se jedim od glavnih izazova u liječenju bolesti ljudi i životinja te predstavlja velik javnozdravstveni problem.



**Slika 8.** *Escherichia coli* (3001)

*B. subtilis* (slika 9.) je Gram-pozitivna bakterija štapićastog oblika koja se nalazi u tlu. Može rasti u mediju s minimalnim hranjivim tvarima koji sadrži potrebne soli, ugljik, dušik i fosfor. Kada se nalazi u mediju s ograničenim hranjivim tvarima može stvoriti čvrstu, zaštitnu endosporu zbog koje preživljava ekstremne vremenske uvjete.



**Slika 9.** *Bacillus subtilis* (3020)

Mnoge vrste i sojevi roda *Bacillus* proizvode velik broj tvari koje imaju antimikrobno djelovanje. *B. subtilis* je bakterija koja proizvodi mnoge metabolite s antifungalnim i antibakterijskim djelovanjem koji su važni u borbi protiv brojnih fitopatogenih mikroorganizama.

*Candida lipolytica* (slika 10.) je askomicetni kvasac koji je široko rasprostranjen u okolišu, mesnim i mliječnim proizvodima. Ima široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji gdje se koristi za proizvodnju aromatskih spojeva, organskih kiselina, polialkohola, emulgatora te površinski aktivnih tvari [10].



**Slika 10.** *Candida lipolytica* (59)

## 2.6. Aromatična biljna porodica Pinaceae

Biljna porodica Pinaceae pripada podrazredu četinjača. Poznato je oko 250 različitih vrsta, a sve su zimzelene biljke visine od 3 do 50 metara prepoznatljive po uskim, igličastim listovima. Najpoznatiji rodovi su [4]:

- *Abies* - **sibirski jela** (*Abies sibirica*), **jela** (*Abies alba*)
- *Cedrus* - **atlanski cedar** (*Cedrus atlantica*), **himalajski cedar** (*Cedrus deodara*), **libanski cedar** (*Cedrus libani*)
- *Larix* - **ariš** (*Larix decidua*)
- *Picea* - **obična smreka** (*Picea excelsa*), **crna smreka** (*Picea mariana*)
- *Pinus* - **bijeli bor** (*Pinus sylvestris*), **crni bor** (*Pinus nigra*).

Po kemijskom sastavu najčešće sadržavaju terpene, estere te seskviterpenske ketone. Karakterizira ih ravno i cilindrično deblo te igličasti listovi. Deblo se najčešće koristi za proizvodnju papira, a nakon sječe se većina stabla odbacuje, uključujući grančice i iglice. Proizvodnjom eteričnog ulja iglice se koriste kao vrijedna sirovina te se time smanjuje količina biootpada. Sastav eteričnog ulja uvelike ovisi o vrsti biljnog materijala, a za potrebe ovog istraživanja korišteni su crni bor, obična smreka, srebrna ili bodljikava smreka te Pančičeva omorika.

### 2.6.1. Crni bor (*Pinus nigra*)

Crni bor je crnogorično stablo rasprostranjeno diljem Europe, sjeverozapadne Afrike i Male Azije. Oblik krošnje ovisi o starosti biljke, u početku je širokog jajolikog oblika (**slika11.**), a u kasnijoj dobi postaje široka s gotovo vodoravnim vrhom. Starost biljke utječe i na oblik kore koja s vremenom postaje raspucana u mnoštvo nepravilnih ljuski te luči obilje smole. Za pripremu eteričnih ulja koriste se tamnozeleno iglice koje mogu biti dugačke od 10 do 15cm.

Eterično ulje bora koristi se u aromaterapiji zbog njegova pozitivnog utjecaja na raspoloženje, uklanjanje stresa i umora te povećanje koncentracije [11]. Česta je primjena i u zdravstvene svrhe jer podiže imunitet, čisti respiratorni sustav, otklanja simptome prehlade, kašlja, astme te gripe [11]. Osim navedenih primjena, eterično ulje bora se koristi se i za [11]: ublažavanje svrbeža i upala na koži, kontroliranje prekomjernog znojenja, sprječavanje gljivičnih infekcija, usporavanje znakova starenja te poboljšanje cirkulacije. Zbog svog mirisa i antibakterijskog svojstva, borovo ulje se koristi i u kozmetičkim proizvodima, sapunima i deterdžentima.



**Slika 11.** *Pinus nigra*

### 2.6.2. Obična smreka (*Picea abies*)

Obična smreka je rasprostranjena u sjevernoj Europi i na planinskim područjima srednje i južne Europe. Koristi se za sprječavanje erozije tla, ali ovoj vrsti smreke pripisuje se i važan ekonomski značaj jer se koristi kao građevinski materijal, a deblo se, zbog svoje kvalitete i stupnja glatkoće, često koristi i za izradu gudačkih instrumenata i namještaja te za proizvodnju papira. Mlade iglice primjenjuju se u medicinske svrhe za pripremu čaja ili sirupa i u aromaterapiji za izolaciju eteričnog ulja s mnogim ljekovitim svojstvima.

Eterično ulje obične smreke ima široku primjenu zbog svog antiseptičkog i antibakterijskog djelovanja. U aromaterapiji se koristi za opuštanje, uklanjanje umora i osjećaja tjeskobe. U zdravstvene svrhe se koristi kao dobar saveznik protiv gripe i prehlade, podiže imunološki sustav te olakšava disanje pri inhalaciji s vrućom vodom [12]. U narodnoj medicini često se koristi čaj od mladih iglica za liječenje kašlja i bronhitisa. Zbog svog svježeg mirisa koristi se za pripremu osvježivača zraka, deterdženata i sapuna.



**Slika 12.** *Picea abies*

### 2.6.3. Srebrna ili bodljikava smreka (*Picea pungens*)

Srebrna smreka ili bodljikava smreka je crnogorično stablo rasprostranjeno u Sjevernoj Americi te Europi. Iznimno je otporna na gradska onečišćenja i ljetne suše pa se često koristi kao ukrasno stablo u parkovima. Karakteristična je po plavkastozelenim oštrim iglicama ugodnog mirisa.

Eterično ulje bodljikave smreke ima dugu povijest uporabe u sauni, parnoj kupelji te kao dodatak kupkama i masažnim uljima zbog svog opuštajućeg djelovanja. Osim što opušta tijelo i smiruje upale, koristi se i za umirivanje kašlja i bronhitisa te čišćenje i zarastanje rana na koži.



**Slika 13.** *Picea pungens*

#### 2.6.4. Pančičeva omorika (*Picea omorika*)

Pančičeva omorika je zimzeleno stablo koje je u 19. stoljeću otkrio botaničar Josip Pančić na planini Tari. Vitko deblo raste do 30 metara visine s uskom, piramidalnom krošnjom. Često se uzgaja kao dekoracija u parkovima zbog svoje otpornosti na mraz, sušu i gradska onečišćenja.

Eterično ulje ima vrlo ugodan miris zbog čega se često nalazi u sastavu osvježivača zraka i deterdženata. U aromaterapiji se koristi kao dodatak kupkama za opuštanje mišića, a pokazalo se djelotvornim i u medicinske svrhe u pripravcima protiv kašlja i prehlade.



**Slika 14.** *Picea omorika*



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je izolirati eterična ulja porodice Pinaceae te nakon izolacije provesti karakterizaciju uzoraka tankoslojnom kromatografijom, plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom. Mikrobiološka aktivnost eteričnih ulja analizirana je disk-difuzijskim testom.

#### 3.2. Biljni materijal

U ovom radu korišteno je 6 uzoraka prikazanih u **tablici 1.**

**Tablica 1.** Vrste i lokacije korištenih uzoraka.

Lokacija	Vrsta	Oznaka uzorka
Zagreb	<i>Picea pungens</i>	UZ1
	<i>Pinus nigra</i>	UZ2, UZ6
Slavonski brod	<i>Pinus nigra</i>	UZ3
	<i>Picea omorika</i>	UZ4
	<i>Picea abies</i>	UZ5

Biljni materijal je ubran i sušen 10-15 dana na sobnoj temperaturi. Prije provođenja eksperimenta iglice su usitnjene na komadiće duljine oko 5 mm.

#### 3.3. Izolacija eteričnog ulja

##### 3.3.1. Hidrodestilacija

Dobivanje eteričnog ulja hidrodestilacijom provedeno je u aparaturi po Clevengeru (**slika 15.**). U tikvicu s okruglim dnom dodan je usitnjeni biljni materijal, 500 mL destilirane vode te kamenčići za vrenje. Sadržaj se zagrijavao grijačem, a destilacija se provodila 2 sata od pada prve kapi. Na graduiranom dijelu aparature očitana je količina dobivenog ulja koje je zatim sakupljeno u zatvorenu posudicu s bezvodnim natrijevim sulfatom i čuvano u hladnjaku.



**Slika 15.** Aparatura za hidrodestilaciju

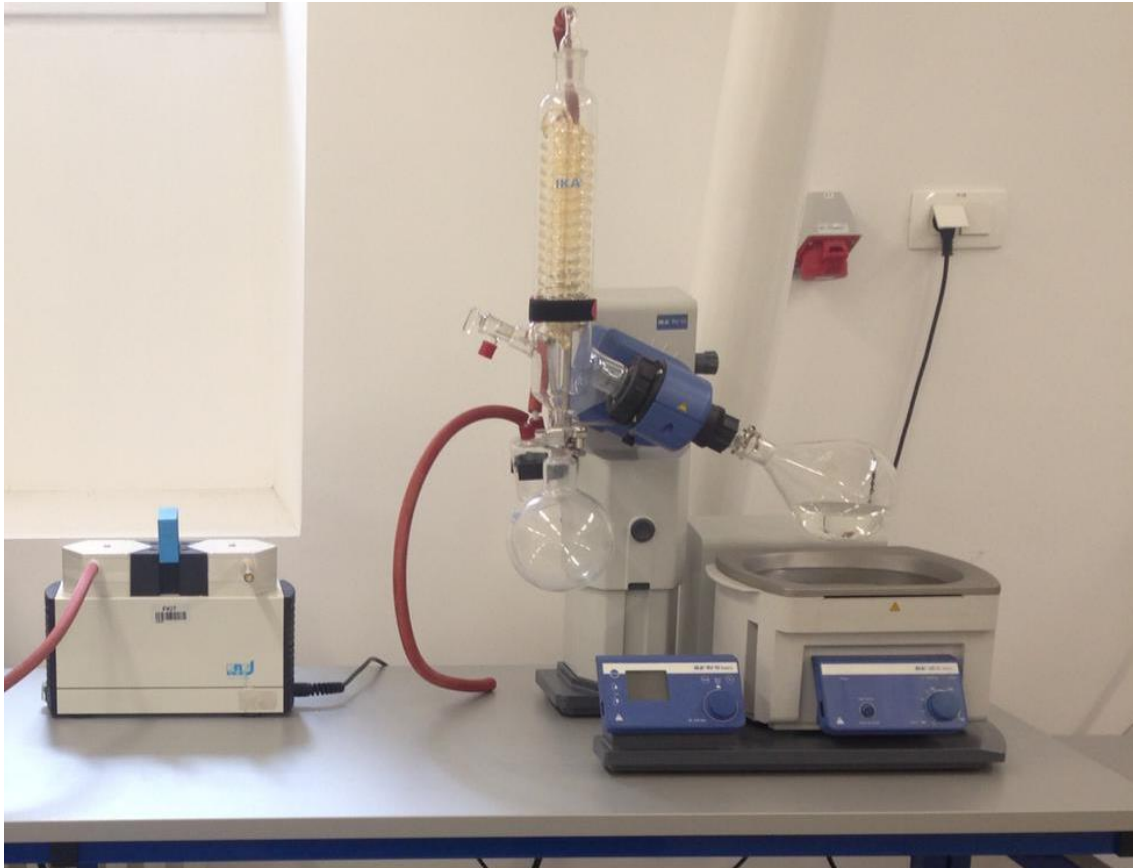
### 3.3.2. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija provodila se pomoću aparature prikazane na **slici 16**. Osušeni i usitnjeni biljni materijal se stavlja u posudu iznad tikvice u kojoj se zagrijava otapalo. Pare otapala kondenziraju i natapaju biljni materijal. Kao otapalo se koristio *n*-heksan, a vrijeme trajanja procesa je 2 sata. *n*-heksan se uklanja isparavanjem pri sniženom tlaku, **slika 17**, a dobiveni produkt čuva se u hladnjaku.



**Slika 16.** Aparatura za Soxhlet ekstrakciju





**Slika 17.** Rotacijski vakuum isparivač

### 3.4. Plinska kromatografija vezana sa spektrometrom masa (GC-MS)

Uzorci eteričnih ulja dobiveni metodom hidrodestilacije podvrgnuti su analizi u spregnutom sustavu plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (Agilent 7890B/5977A), **slika 18**. Uzorci su pripremljeni za analizu otapanjem eteričnog ulja u *n*-heksanu u omjeru 1:100 nakon čega je po 1 mL uzorka injektirano u split modu (1:50). Kao plin nositelj korišten je helij, uz protok 1 mL/min. Sastavnice eteričnog ulja odijeljene su u kapilarnoj koloni HP-5ms (5% fenil-metilpolisiloksan) duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma 0,25 mm. Za analizu korišten je sljedeći temperaturni program: početna temperatura kolone 60 °C/1 min, nakon toga slijedi zagrijavanje 3 °C/min do 200 °C te zadržavanje temperature kolone 10 min na 200 °C. Odijeljene sastavnice analizirane su na masenom spektrometru (EI 70 eV, *m/z* 40-400), a obrada dobivenih rezultata provedena je korištenjem računalnog paketa Agilent GC/MSD ChemStation verzija F.01.03. Sastavnice eteričnog ulja identificirane su usporedbom spektara masa u bazi NIST14, Wiley 9iHPCH 2205.



**Slika 18.** Plinski kromatograf sa spektrometrijom masa (GC-MS).

### 3.5. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri uzoraka eteričnih ulja snimljeni su, bez prethodne pripreme, u području valnih brojeva od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$  na uređaju prikazanom na **slici 19**.



**Slika 19.** Infracrveni spektrofotometar s Fourierovom transformacijom signala *BrukerVertex 70*, ZAKTN, FKIT

### 3.6. Tankoslojnakromatografija (TLC)

Uzorci su analizirani tankoslojnom kromatografijom (TLC analiza), pri čemu se kao stacionarna faza koristila pločica silikagela (Silikagel 60 F254), a kao pokretna faza smjesa etil-acetata i toluena u omjeru 5:95 V/V. Uzorci eteričnih ulja pripremljeni su otapanjem 20  $\mu\text{L}$  ulja u 1 mL toluena, a poredbena otopina pripremljena je otapanjem 10  $\mu\text{L}$  bornil-acetata i 2 mg borneola u 1 mL toluena. Na tanki sloj pločice nanese se 10  $\mu\text{L}$  ispitivane otopine u liniji te je sustav stavljen u čašu s odgovarajućim sustavom otapala. Razvijanje je prekinuto kada je dostignuta fronta otapala u visini od 8 cm nakon čega se pločica sušila na zraku. Nakon sušenja, razvijena pločica se poprskala s anisaldehyd reagensom koji je dobiven miješanjem 0,5 mL anisaldehyda s 10 mL ledene octene kiseline, 85 mL metanola i 5 mL sulfatne kiseline. Sustav se zagrijava u sušioniku na 100-105 °C u trajanju 5-10 minuta te odmah promotri na dnevnom svjetlu.

### 3.7. Mikrobiološka analiza

#### 3.7.1. Bakterijske kulture

Za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti korištene su bakterijske kulture *Escherichia coli* (3001) i *Bacillus subtilis* (3020) te kvasac *Candida lipolytica* (59), koji su izolirani iz okoliša.

#### 3.7.2. Priprema hranjive podloge

U Erlenmeyer-ovim tikvicama su, prema uputama proizvođača (Biolife Manual, second edition, Ingraf, Italija 1991.), pripremljene hranjive podloge za uzgoj bakterija (hranjivi agar) i kvasca (malt agar). Za ispitivanje testa osjetljivosti koristila se Mueller Hinton Broth podloga. Priređene podloge su homogenizirane, zagrijane do vrenja te nakon toga sterilizirane u autoklavu pri 120 °C i 1,1 atm u trajanju od 15 minuta.

#### 3.7.3. Priprava suspenzija bakterija

Navedene kulture uzgojene su na kosoj hranjivoj podlozi dan prije postavljanja pokusa te stavljene na inkubaciju na temperaturu od 37 °C (*E. coli* i *B. subtilis*) odnosno 28°C (*C. lipolytica*). Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata, sterilnom mikrobiološkom ušicom prenijela se mala količina dobivene kulture u 10  $\text{cm}^3$  sterilne fiziološke vode i homogenizirala. Početan broj stanica ispitivanih mikroorganizama prilagođen je gustoći suspenzije od 0.5 McFarland radi postizanja  $10^6 \text{ stcm}^{-3}$ .

#### 3.7.4. Određivanje prijenosa antimikrobnih sastojaka–difuzijski test

Ispitivanje antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja provedeno je disk-difuzijskim testom prema standardnom postupku NCCLS *disc diffusion method* (CLSI, 2012). 0,1 cm<sup>3</sup> pripremljenih suspenzija otpipetiralo se na Mueller Hinton Broth podlogu u Petrijevoj zdjelici i homogeniziralo sa štapićem po Drigalskom. Na hranjivu podlogu postavili su se diskčići promjera 6 mm na koje se otpipetiralo po 0,02 cm<sup>3</sup> dobivenih uzoraka eteričnog ulja. Petrijeve zdjelice u kojima su se nalazile bakterije (*E. coli* i *B. subtilis*) inkubirane su na temperaturu od 37 °C u trajanju od 24 sata, a zdjelica s kvascem (*C. lipolytica*) inkubirana je na temperaturi od 28 °C u trajanju od 3 dana. Nakon inkubacije izmjerena je zona inhibicije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

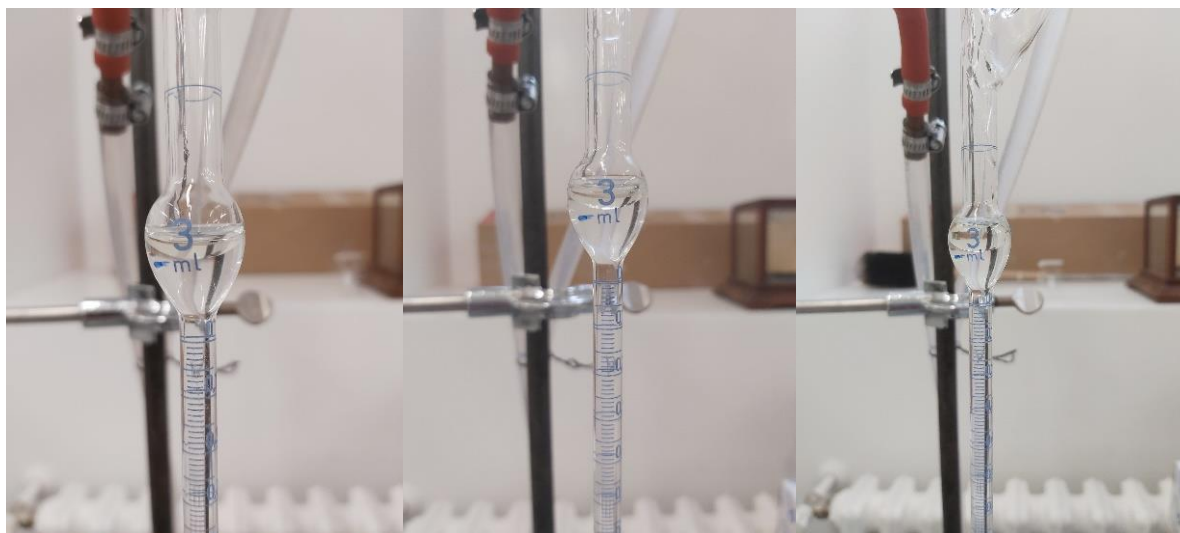
Izolacija eteričnih ulja u ovom radu provedena je postupcima hidrodestilacije i Soxhlet ekstrakcije. Dobivena su eterična ulja svijetlo žute boje čiji se prinos razlikovao ovisno o vrsti biljnog materijala i metodi izolacije. Karakterizacija dobivenih uzoraka provedena je tankoslojnom kromatografijom (TLC), plinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa (GC-MS) te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR). Mikrobiološka aktivnost uzoraka analizirana je disk-difuzijskom metodom.

### 4.1. Prinos eteričnog ulja

U **tablici 2.** prikazan je prinos uzoraka eteričnih ulja vrste *Picea pungens* (UZ1), *Picea omorika* (UZ4), *Picea abies* (L.) H. Karst (UZ5) i *Pinus nigra* J. F. Arnold (UZ6) u mL/100g osušenog biljnog materijala, dobivenih metodom hidrodestilacije po Clevengeru.

**Tablica 2.** Prinos eteričnih ulja iskazana u mL/100g osušenog biljnog materijala.

Vrsta	Uzorak	Prinos (mL/100g)
<i>Picea pungens</i>	UZ1	0,03
<i>Picea omorika</i>	UZ4	0,34
<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst	UZ5	0,32
<i>Pinus nigra</i> J. F. Arnold	UZ6	0,79



**Slika 20.** Dobiveno eterično ulje vrste *Picea omorika* (UZ4),

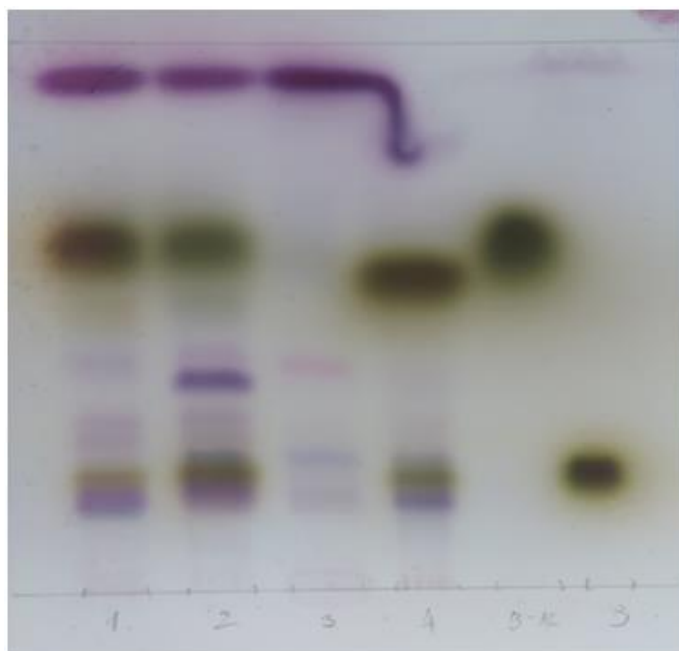
*Picea abies* (L.) H. Karst (UZ5) i

*Pinus nigra* J. F. Arnold (UZ6)

Usporedbom rezultata prikazanih u **tablici 2.** vidljivo je da je najveći prinos eteričnog ulja dobiven hidrodestilacijom vrste *Pinus nigra* što je u skladu s rezultatima koje su dobili Sezik i suradnici [13] za biljne materijale prikupljene u ljetnim mjesecima. Hidrodestilacijom 100g iglica vrste *Picea abies* (L.) H. Karst dobiveno je 0,32 mL što je mnogo veći prinos od očekivanog prema literaturnim izvorima. Kartnig i suradnici [12] dobili su 4,7 mL ulja, a hidrodestilaciju su provodili s 10 kilograma biljnog materijala.

## 4.2. Kemijski sastav eteričnog ulja

### 4.2.1. Tankoslojna kromatografija

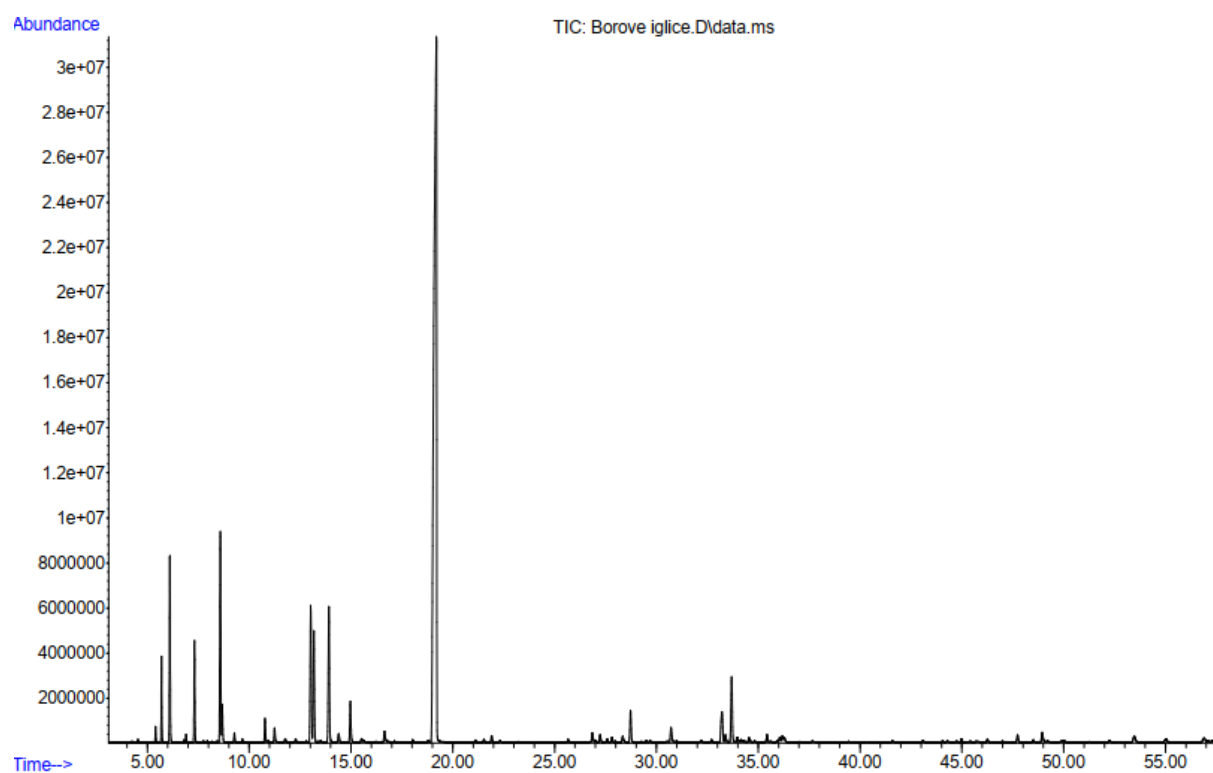


**Slika 21.** TLC – analiza uzoraka *Picea omorika* (UZ4, 1), *Picea abies* (UZ5, 2), *Pinus nigra* (UZ6, 3) i *Picea pungens* (UZ1, 4)

Tankoslojnom kromatografijom utvrđeno je da uzorci eteričnih ulja vrste *Picea omorika* i *Picea abies* sadrže bornil-acetat i borneol, što se slaže s rezultatima istraživanja koje su proveli Nikolić i suradnici [14] te Radulescu i suradnici [15], koji su u sva četiri ispitivana uzorka dokazali prisutnost bornil-acetata i borneola. Uzorak vrste *Pinus nigra* ne sadrži promatrane sastavnice što se slaže s literaturnim izvorom [13]. U istraživanju koje su proveli Bonikowska i suradnici [16] uočeno je da eterično ulje vrste *Picea pungens* dobiveno iz sjemenki ne sadrži bornil, dok se bornil-acetat nalazi u sastavu ulja u udjelu manjem od 1%. Uzorak dobiven hidrodestilacijom iglica sadrži obje analizirane sastavnice pri čemu dolazi do odstupanja od literaturnog primjera [16].

#### 4.1.2. Plinska kromatografija vezana sa spektrometrom masa

Kromatogrami uzoraka eteričnih ulja prikazani su na slikama 22, 23., 24. i 25., a sastavnice s pripadajućim vremenom zadržavanja i udjelom u tablicama 3., 4., 5. i 6..



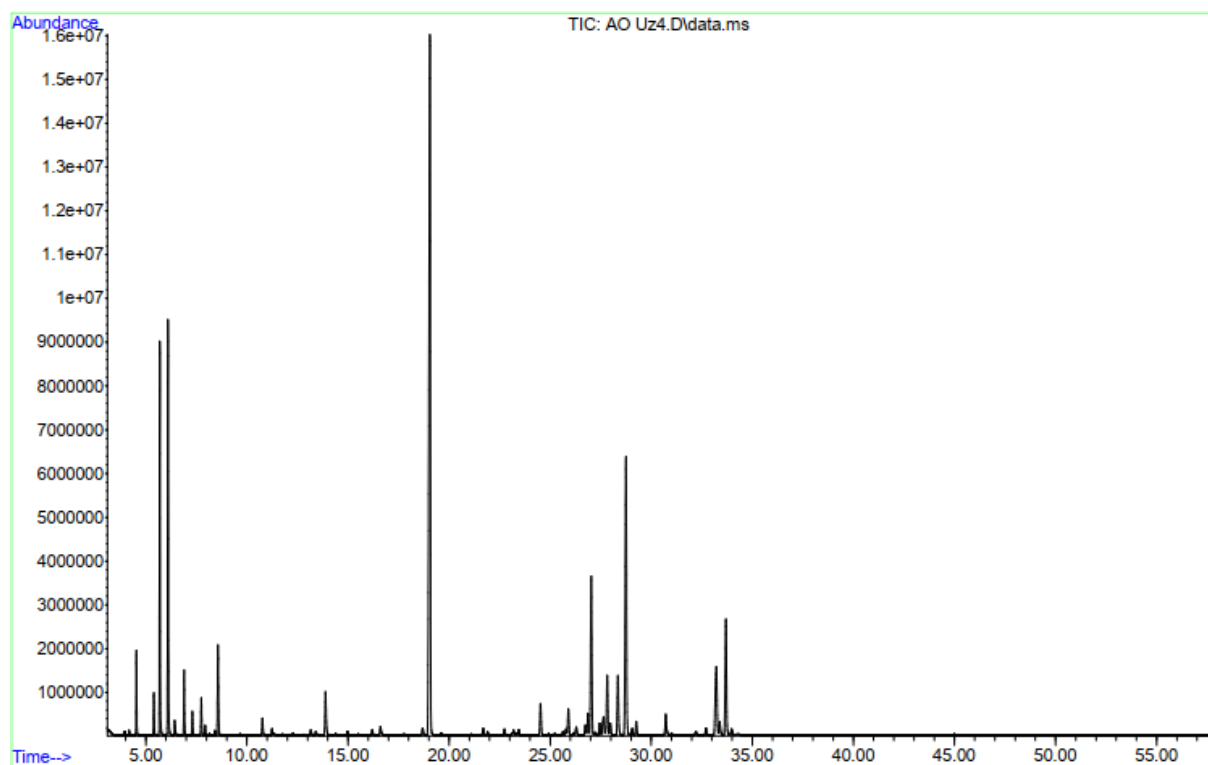
**Slika 22.** Kromatogram uzorka eteričnog ulja vrste *Picea pungens* (UZ1)

**Tablica 3.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja vrste *Picea pungens* (UZ1)

Sastavnica	Vrijeme zadržavanja	Postotak
$\alpha$ -pinen	5,69	1,71
kamfen	6,10	3,92
mircen	7,32	2,25
limonen	8,59	5,28
kamfor	13,02	4,41
kamfen hidrat	13,18	3,31
borneol	13,92	4,40
$\alpha$ -terpineol	14,97	1,33
bornil-acetat	19,19	53,19
?	28,73	1,10
?	33,70	2,42

Eterično ulje vrste *Picea pungens* dobiveno je hidrodestilacijom iglica, a po sastavu se razlikuje od literaturnog primjera [16] gdje je eterično ulje dobiveno iz sjemenki. Karakterizacijom eteričnog ulja koje su dobili Bonikowska i suradnici [16] utvrđeno je da su

dominantne sastavnice limonen (43,8%),  $\beta$ -pinen (23,3%) te  $\alpha$ -pinen (16,4%). U ulju dobivenom iz iglica najzastupljenija sastavnica je bornil-acetat (**tablica 3.**), dok se u ulju dobivenom iz sjemenki bornil acetat nalazi u udjelu manjem od 1%.



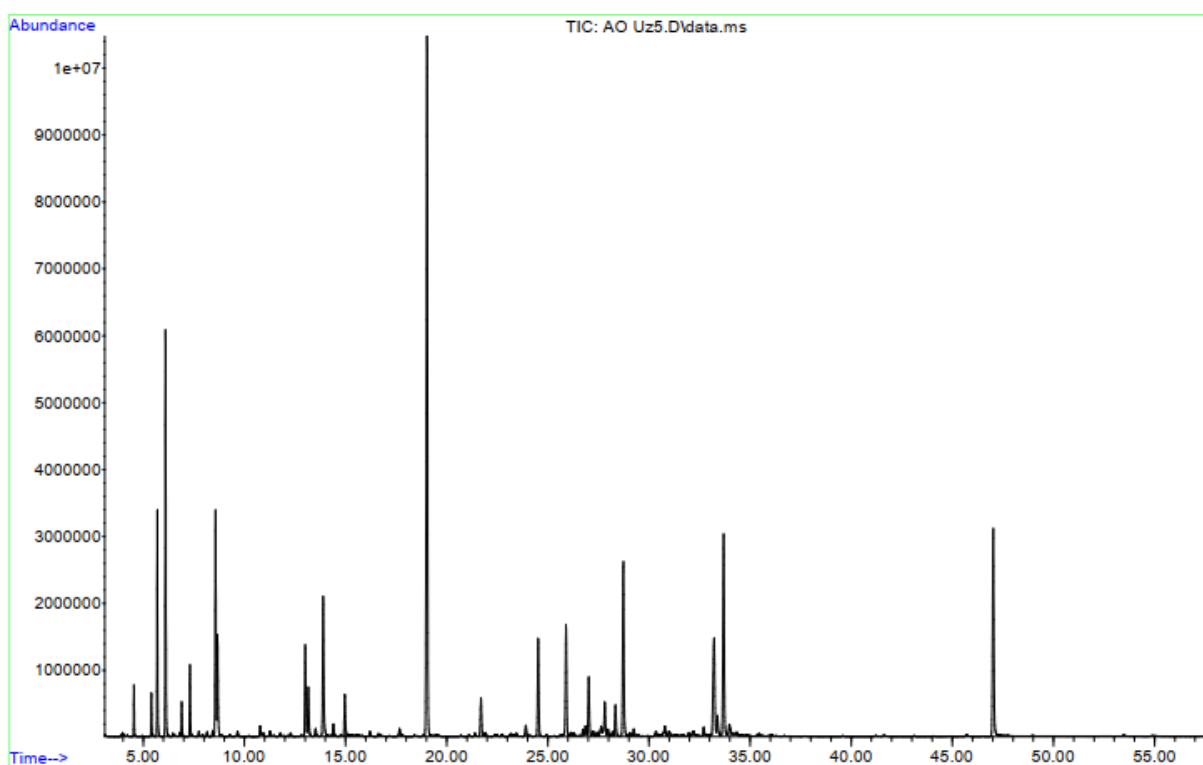
**Slika 23.** Kromatogram uzorka eteričnog ulja vrste *Picea omorika* (UZ4)

**Tablica 4.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja vrste *Picea omorika* (UZ4)

Sastavnica	Vrijeme zadržavanja	Postotak
santen	4,53	1,49
$\alpha$ -pinen	5,69	8,38
kamfen	6,10	9,27
$\beta$ -pinen	6,89	1,55
$\delta$ -karen	8,60	2,62
borneol	13,88	1,54
bornil-acetat	19,06	28,79
kariofilen E	24,52	1,15
germakaren D	27,03	5,91
muurolen	27,82	2,28
kadinen $\gamma$	28,35	2,31
?	28,75	10,62
?	33,22	3,63
?	33,69	4,39



Hidrodestilacijom 100g iglica vrste *Picea omorika* dobiveno je 0,34mL eteričnog ulja čije su sastavnice prikazane u **tablici 4.** Dominantne sastavnice su monoterpeni: bornil-acetat (28,29%), kamfen (9,27%),  $\alpha$ -pinen (8,38%) i germakaren D (5,91%), što je u skladu s publiciranim člancima [14]. Ostale identificirane sastavnice su udjela manjeg od 3%. U istraživanju koje su proveli Nikolić i suradnici [14] uspoređivao se sastav eteričnih ulja vrste *Picea omorika* s različitim geografskih područja pri čemu je dobiven visok stupanj sličnosti u kemijskom sastavu. Usporedbom dobivenih rezultata uočljivo je da endemske vrste, kao što je *Picea omorika*, pokazuju manju genetsku raznolikost u usporedbi s ostalim vrstama četinjača, ali je i dalje uočljiv karakterističan sastav s obzirom na lokalitet na kojem je uzorak sakupljen[14].



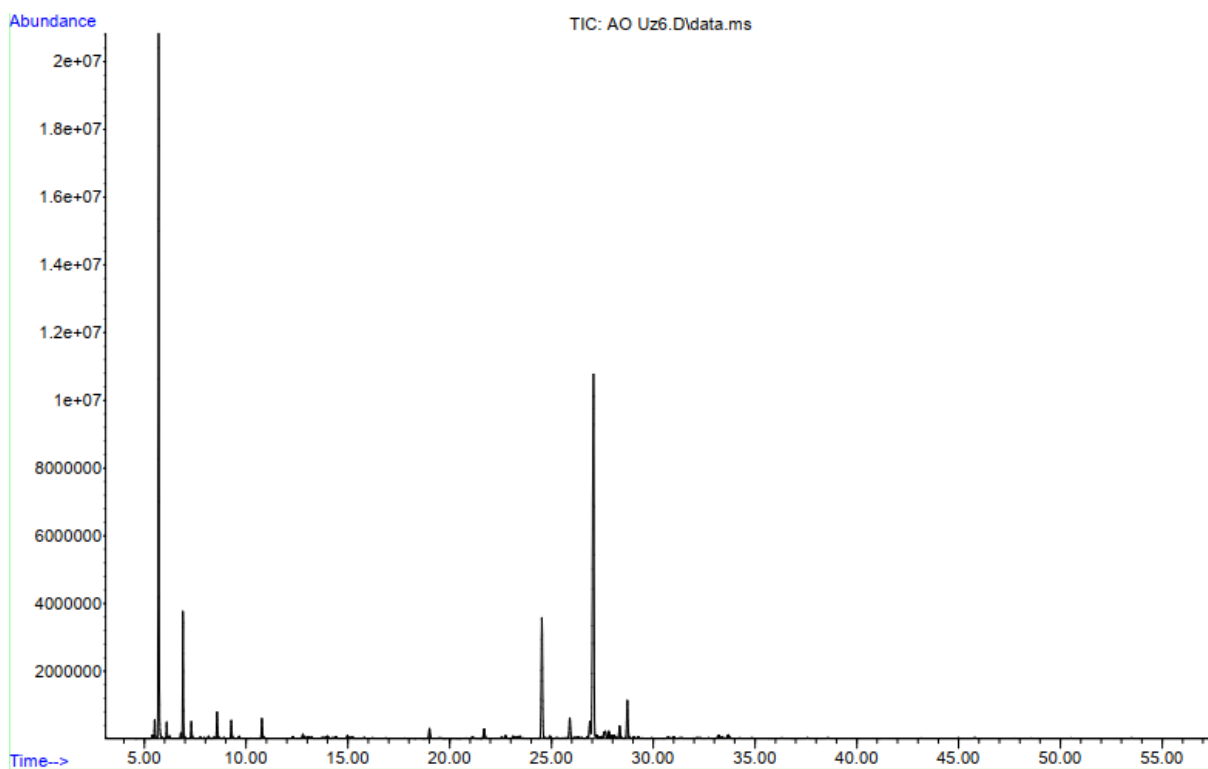
**Slika 24.** Kromatogram uzorka eteričnog ulja vrste *Picea abies* (L.) H. Karst (UZ5)

Kemijskom analizom uzorka vrste *Picea abies* (L.) H. Karst identificirano je 61,98% sveukupnog udjela sastavnica od čega je najveći udio bornil-acetata (21,97%), kamfena (7,91%), limonena (5,23%), borneola (4,23%) i  $\alpha$ -pinena (4,15%), **tablica 5.**

**Tablica 5.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja vrste *Picea abies* (L.) H. Karst (UZ5)

Sastavnica	Vrijeme zadržavanja	Postotak
$\alpha$ -pinen	5,70	4,15
kamfen	6,10	7,91
mircen	7,31	1,50
limonen	8,57	5,23
1,8 cineol	8,67	2,42
kamfor	13,01	2,56
?	13,16	1,48
borneol	13,89	4,23
$\alpha$ -terpineol	14,96	1,27
bornil-acetat	19,03	21,97
kariofilen E	24,52	3,04
$\alpha$ -humulen	25,90	3,55
germakren D	27,02	1,91
muurolen	27,82	1,23
$\Gamma$ -kadinen	28,35	1,01
?	28,73	5,74
?	33,22	4,38
?	33,70	6,50
?	47,03	7,17

Izolacija eteričnog ulja vrste *Pinus nigra* J.F. Arnold provodila se Soxhlet ekstrakcijom (UZ2) i hidrodestilacijom (UZ6). Metodom hidrodestilacije dobiveno je eterično ulje, dok je Soxhlet ekstrakcijom dobiven tamni smolasti produkt koji nije analiziran na GC-MS-u. U **tablici 6.** prikazan je kemijski sastav eteričnog ulja. Dominantna komponenta u uzorku dobivenom hidrodestilacijom po Clevengeru je  $\alpha$ -pinen (34,16%). Usporedbom kemijskog sastava eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom uočeno je slaganje s istraživanjima iz centralne Italije [13]. Macchioni i suradnici [13] su kao glavne komponente istaknuli  $\alpha$ -pinen (28,4%), germakren D (21,2%) i  $\beta$ -pinen (6,2%).



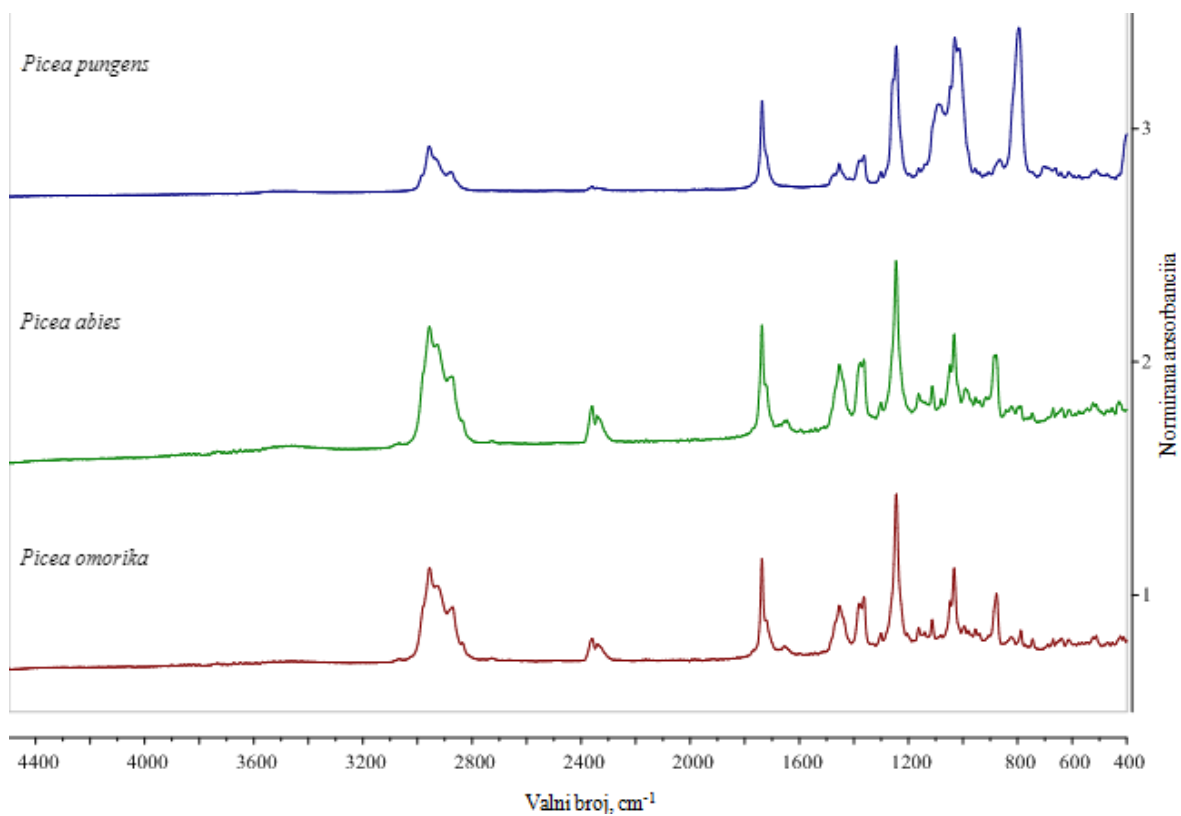
**Slika 25.** Kromatogram uzorka eteričnog ulja vrste *Pinus nigra* J. F. Arnold (UZ6)

**Tablica 6.** Kemijski sastav uzorka eteričnog ulja vrste *Pinus nigra* J. F. Arnold (UZ6)

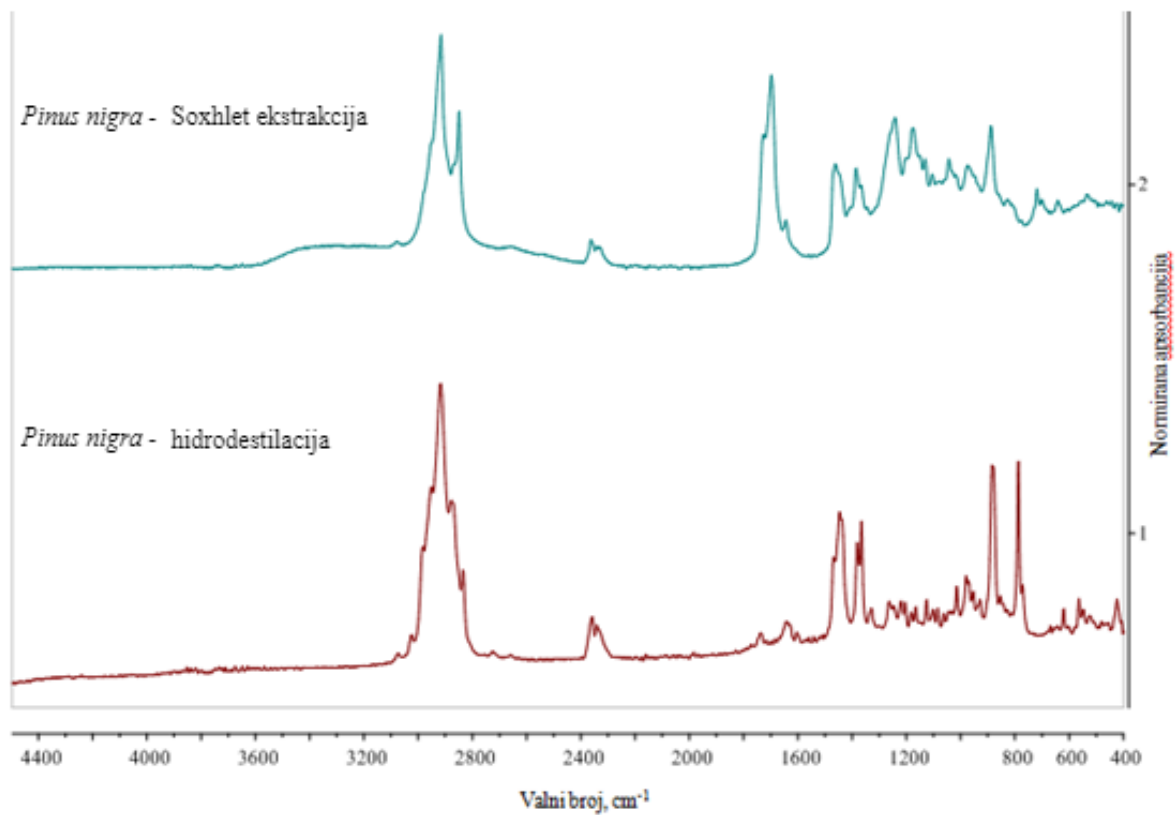
Sastavnica	Vrijeme zadržavanja	Postotak
$\alpha$ -pinen	5,71	34,16
$\beta$ -pinen	6,90	6,22
$\delta$ -3-karen	8,58	1,54
ocimen	9,27	1,01
terpinolen	10,78	1,27
kariofilen E	24,53	8,97
humulen $\alpha$	25,90	1,52
?	26,89	1,32
germakren D	27,06	29,79
?	28,73	2,81

#### 4.2.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

Na **slici 26.** prikazani su usporedbeni spektri uzoraka vrsta *Picea pungens*, *Picea abies* i *Picea omorika*, a na **slici 27.** usporedbeni spektri vrste *Pinus nigra* dobiveni Soxhlet ekstrakcijom i hidrodestilacijom.



Slika 26. FTIR spektri uzoraka vrste *Picea pungens*, *Picea abies* i *Picea omorika*.



Slika 27. FTIR spektri uzoraka vrste *Pinus nigra* J.F. Arnold.

Na FTIR spektru eteričnog ulja crnog bora (*Pinus nigra*) mogu se uočiti pikovi karakteristični za  $\alpha$ -pinen pri valnim brojevima: 1445,88  $\text{cm}^{-1}$ , 1014,45  $\text{cm}^{-1}$ , 884,31  $\text{cm}^{-1}$  i 787,16  $\text{cm}^{-1}$ . FTIR spektri produkata dobivenih Soxhlet ekstrakcijom i hidrodestilacijom bitno su različiti. Iako se uljna tvar ekstrahira iz biljnog materijala pomoću *n*-heksana, osim eteričnog ulja očito je da su se u *n*-heksanu otopile i neke druge komponente prisutne u iglicama crnog bora. Navedeni pikovi ne nalaze se na smolastom produktu dobivenom Soxhlet ekstrakcijom. Pikovi na valnim brojevima: 1644,54  $\text{cm}^{-1}$ , 1461,57  $\text{cm}^{-1}$  i 1385,48  $\text{cm}^{-1}$  upućuju na prisutnost kariofilena i  $\alpha$ -pinena, a pikovi u intervalu 1730 do 1700  $\text{cm}^{-1}$  i pri valnom broju 1241,32  $\text{cm}^{-1}$  na prisutnost estera i masnih kiselina [17].

S obzirom na rezultate GC-MS analize kojima je u uzorcima eteričnih ulja dobivenih hidrodestilacijom iglica smreke (*Picea pungens*, *Picea abies* i *Picea omorika*) na snimljenim FTIR spektrima identificirani su pikovi karakteristični za najzastupljeniju sastavnicu, odnosno bornil acetat, koji se nalaze na sljedećim valnim brojevima: 1736  $\text{cm}^{-1}$ , 1454  $\text{cm}^{-1}$ , 1362  $\text{cm}^{-1}$  i 1244  $\text{cm}^{-1}$ . FTIR spektri eteričnih ulja smreke vrlo su slični što upućuje na to da uglavnom sadrže iste komponente. Razlikuju se u koncentraciji pojedine sastavnice što za posljedicu ima pikove različitog intenziteta.

### 4.3. Mikrobiološka analiza

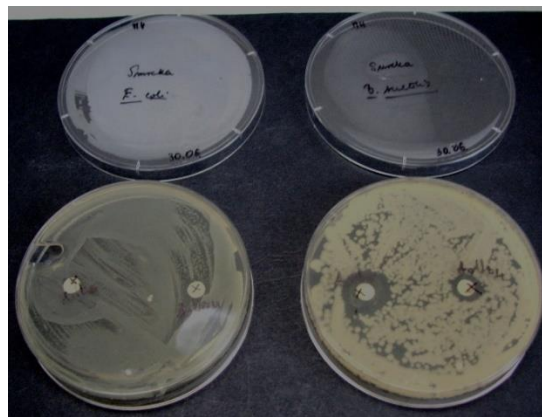
Na **slikama 28., 29., 30. i 31.** prikazan je utjecaj dobivenih uzoraka eteričnih ulja na bakterijske kulture *Escherichia coli* (3001) i *Bacillus subtilis* (3020) te kvasac *Candida lipolytica* (59). Zone inhibicije izmjerene u mm prikazane su u **tablici 7.**



**Slika 28.** Utjecaj eteričnih ulja vrste *Pinus nigra* J.F. Arnold na bakterijske kulture *E. coli* i *B. subtilis*.



**Slika 29.** Utjecaj eteričnih ulja vrste *Pinus nigra* J.F. Arnold na kvasac *C. lipolytica*.



**Slika 30.** Utjecaj eteričnih ulja vrste *Picea omorika* i *Picea abies* (L.) H. Karst na bakterijske kulture *E. coli* i *B. subtilis*.



**Slika 31.** Utjecaj eteričnih ulja vrste *Picea omorika* i *Picea abies* (L.) H. Karst na kvasac *C. lipolytica*.

**Tablica 7.** Antimikrobna aktivnost uzoraka eteričnih ulja.

	<i>Pinus nigra</i> (UZ2)	<i>Picea omorika</i> (UZ4)	<i>Picea abies</i> (UZ5)	<i>Pinus nigra</i> (UZ6)
<i>d(E. coli) / mm</i>	-	2	-	-
<i>d(B. subtilis) / mm</i>	3	3	4	2
<i>d(C. lipolytica) / mm</i>	3	10	10	7

Od ispitanih uzoraka u ovom radu jedino je uzorak eteričnog ulja *Picea omorika* pokazao blagi inhibirajući utjecaj prema bakterijskoj kulturi *E. coli* (**slika 30.**). Sva četiri analizirana uzorka pokazala su inhibirajući utjecaj prema Gram-pozitivnoj bakteriji *B. subtilis*, a najveći utjecaj uočen je prema kvascu *C. lipolytica* (**slike 29. i 31.**). Takva mikrobiološka aktivnost ulja može se pripisati visokoj koncentraciji bornil-acetata [15] i terpena, posebice  $\alpha$  i  $\beta$ -pinena, germakrena D i limonena [3], koji se nalaze u uzorcima u visokim koncentracijama. Uočene razlike u osjetljivosti mogu ovisiti o mehanizmu djelovanja sastavnica eteričnih ulja na različite bakterijske kulture [3].

## ZAKLJUČAK

Izolacijom eteričnog ulja četinjača dobiveni su različiti prinosi ovisno o vrsti biljnog materijala koji se koristio, a najveći prinos dobiven je hidrodestilacijom iglica crnog bora (*Pinus nigra*). Uzorci eteričnih ulja dobiveni hidrodestilacijom iglica smreke sadrže uglavnom iste sastavnice, ali u različitim koncentracijama. Dominantna sastavnica u sva tri analizirana uzorka (*Picea pungens*, *Picea abies* i *Picea omorika*) je bornil-acetat (21,97-53,19%). Mikrobiološkom analizom utvrđeno je da jedino uzorak vrste *Picea omorika* pokazuje blagi inhibirajući utjecaj prema Gram-negativnoj bakterijskoj kulturi. Svi uzorci su pokazali inhibirajući učinak prema Gram-pozitivnoj bakteriji, a najintenzivniji utjecaj imali su na kvasac *C. lipolytica*.



## Literatura

- [1] Teixeira, S.D., Fiorio, J.L., Galvan, D., Sefstrom, C., Cogo, P.M., Junior, V.S., Rodrigues, M.B., Hendges, A.P.P.K., Maia, B.H.L., Benghi, T.G.S., Investigation on chemical composition and optimization of essential oil obtainment from waste *Pinus taeda* L. using hydrodistillation, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **59** (2016) e16150043.
- [2] Baser, K. H. C., Buchbauer, G., Hand book of essential oils: science, technology, and applications, CRC Press, Boca Raton, 2010., str. 3-5.
- [3] Politeo, O., Skocibusic, M., Maravic, A., Ruscic, M., Milosa, M., Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Endemic Dalmatian Black Pine (*Pinus nigra* ssp. *dalmatica*), *Chem. Biodiversity*, **8** (2011) 540-547.
- [4] Marković, S., Fitoaromaterapija, Centar Cedrus, Zagreb, 2005., str. 79-81, 161-164.
- [5] <https://fineartamerica.com/featured/oil-glands-on-sepal-of-lavender-flower-dr-jeremy-burgessscience-photo-library.html> (pristup 10. srpnja 2020.)
- [6] <https://gwenythsantagate.com/2016/03/10/what-are-essential-oils/> (pristup 10. srpnja 2020.)
- [7] New directionsaromatics blog, <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html> (pristup 27. travnja 2020.)
- [8] Plantagea, <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/obrada-i-skladistenje/> (pristup 29. travnja 2020.)
- [9] Grgić, D.K., Bera, L., Miloloža, M., Cvetnić, M., Markić, M., Vesna Ocelić Bulatović, V.O., Bolanča, T., Estimation of antibacterial activity of selected macrolides, 2019.
- [10] Zhao, Y., Chan, J.F.W., Tsang, C.C., Wang, H., Guo, D., Xiao, Y., Yue, N., Chen, J.H.K., Lau, S.K.P., Xu, Y., Woo, P.C.Y., Clinical Characteristics, Laboratory Identification, and *InVitro* Antifungal Susceptibility of *Yarrowia (Candida) lipolytica* Isolates Causing Fungemia: a Multicenter, Prospective Surveillance Study, *J. Clin. Microbiol* **53** (2015) 3639-3645.
- [11] New directionsaromatics blog, <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/products/all-about-pine-oil.html> (pristup 29. travnja 2020.)

- [12] Kartnig, T., Still, F., Reinthalerb, F., Antimicrobial activity of the essential oil of young pine shoots (*Picea abies* L.), J. Ethnopharmacol., **35** (1991) 155- 157.
- [13] Sezik, E., Ustun, O., Demirci, B., Baser, K.H.C., Composition of the essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey, Turk J. Chem., **34** (2010) , 313 – 325.
- [14] Nikolić, B., Tešević, V., Đorđević, I., Marin, P.D., Bojović, S., Essential Oil Variability in Natural Populations of *Picea omorika*, a Rare European Conifer, Chem. Biodiversity, **6** (2019) 193-203.
- [15] Radulescu, V., Saviuc, C., Chifiriuc, C., Oprea, E., Ilies, D.C., Marutescu, L., Lazar, V., Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Shoots Spruce (*Picea abies* L), REV. CHIM., **1** (2011) 69-74.
- [16] Bonikowska, A.W., Karna, E., Wiktorowska-Owczarek, A., Sienkiewicz, M., Composition and Biological Activity of *Picea pungens* and *Picea orientalis* Seed and Cone Essential Oils, Chem. Biodiversity, **14** (2017), e1600264.
- [17] Taraj , K., Malollari, I., Ylli, F., Maliqati, R., Andoni, A., Llupa , J., Spectroscopic study on chemical composition of essential oil and crude extract from Albanian *Pinus halepensis* Mill., Journal of Agricultural Informatics **9** (2018) 41- 46.