Kemijski sastav i biološka aktivnost eteričnih ulja

Štefanac, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:390851

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Dora Štefanac

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA

Diplomski rad

Akademska godina: 2017./2018.

Mentor:

prof. dr. sc. Igor Jerković

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Dora Štefanac

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA

Diplomski rad

Akademska godina: 2017./2018.

Mentor:

prof. dr. sc. Igor Jerković

Split, listopad 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavnii predmet:
Tema rada je prihvaćena u prosincu 2017. na sjednici vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Igor Jerković
Pomoć pri izradi:

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA

Dora Štefanac, broj indeksa: 111

Sažetak:

Eterična ulja su više ili manje složene smjese prirodnih spojeva, produkti metabolizma biljaka. Hlapljiva su te se zbog toga najčešće izdvajaju procesom destilacije. Ispitivanja kvalitete eteričnih ulja i zahtjevi za kakvoću pojedinog ulja, navedena su u monografijama Farmakopeje ili AFNOR/ ISO normama.

Eterično ulje sadrži veliki broj spojeva. U kemijskom sastavu obično dominiraju dvije ili više komponenti, dok su ostale prisutne u tragovima. U kemijski sastav ulaze terpeni (mono- ili seskvi-terpeni), fenilpropanski derivati i ostali spojevi.

Biološka aktivnost eteričnih ulja ovisi o njihovom kemijskom sastavu. Zbog svoje lipofilnosti eterična ulja lako prolaze fosfolipidni dvosloj stanične membrane mnogih bakterija i gljivica te ostvaruju antimikrobno djelovanje. Na više načina eterična ulja djeluju citotoksično na stanice. Mogu mijenjati propusnost stanične membrane za ione, ometati rad ATP crpke i dovoditi do energetskog deficita, mijenjati sastav membrane ili povećavajati njezinu fluidnost. Neka eterična ulja su potencijalno toksična. Eterično ulje bergamota sadrži bergapten koja se uslijed izlaganja sunčevoj energiji aktivira u oblike koji dovode do oštećenja stanice. Mnogim eteričnim uljima, tj. njihovim glavnim komponentama (npr. bergapten, safrol) ispituje se utjecaj na genetski materijal i stvaranje mutacija, odnosno njihova mutagenost i kancerogenost. S druge strane, eterično ulje kamilice ili često korišten začin cimet pokazuju svojstva "dezmutagena" koji štite od mutageneze. Eterična ulja s terpenoidima i fenolima poput kaduljinog ili origanovog, štite stanice od oksidacijskog stresa. Zbog svog antivirusnog djelovanja 1,8-cineol vrlo je popularan u liječenju infekcija dišnih puteva kao i druga eterična ulja s aldehidima koji su odgovorni za antivirusni učinak. Eterično ulje lavande djeluje anksiolitički i spazmolitički. Kao analgetici stoljećima se primjenjuju klinčić (eugenol je djelatna komponenta) i paparena metvica ((-)-mentol je djelatna komponenta). Eterična ulja bogata 1,8-cineolom, eterično ulje eukaliptusa globulusa, ružmarina, anisa i komorača našli su primjenu u liječnju kašlja jer djeluju kao ekspektoransi i mukolitici. Eterično ulje kima poznato je po svom učinku u probavnom sustavu i ublažavanju nadutosti. Eterična ulja citronele koriste se zbog svog repelentnog djelovanja. Mnoga eterična ulja imaju primjenu u kozmetici, pospješuju regeneraciju kože, uklanjaju ožiljke, daju specifične note parfemima. Osim u kozmetologiji, danas su eterična ulja popularna i kao začini i konzervansi u prehrambenoj industriji.

Zbog mnogih navedenih poznatih učinaka, eterična ulja i njihove glavne komponente postaju značajni predmeti znanstvenih istraživanja i primjene u svakodnevnom životu.

Ključne riječi: eterično, ulje, sastav, biološka aktivnost

Rad sadrži: 82 stranice, 18 slika, 2 tablice, 107 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. - predsjednik izv. prof. dr. sc. Ani Radonić
2. - član izv. prof. dr. sc. Vesna Sokol
3. - član-mentor prof. dr. sc. Igor Jerković

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title:
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session on December 2017 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine
Mentor: prof. dr. sc. Igor Jerković
Technical assistence:

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSETIAL OILS

Dora Štefanac, index number: 111

Summary:

Essential oils are more or less complex mixtures of natural compounds, products of plant metabolism. They are volatile and are therefore most often isolated by the distillation process. Tests of quality essential oils and requirements for the quality of individual oils are listed in the monographs Pharmacopoeia or AFNOR / ISO norms.

Essential oils contain a large number of compounds. The chemical composition is usually dominated by two or more components, while others are traceable. The chemical composition includes terpenes (mono- or sesquiterpene), phenylpropane derivatives, and other compounds.

Biological activity of the essential oils depends on their chemical composition. Because of their lipophilicity they easily pass the phospholipid bilayer cell membranes of many bacteria and fungi and exhibit antimicrobial activity. In many ways the essential oils act cytotoxic to the cells. They can change ion band membrane permeability, interfere with ATP pump operation, and lead to energy deficit, change membrane composition, or increase its fluid flow. Some essential oils are potentially toxic. Bergamot oil contains a psoralen molecule called bergapten which, due to the exposure to sunlight, activates into forms that cause cell damage. Many essential oils, or their major components (ex. bergapten, safrol) are investigating due to their effect on genetic material and the formation of mutations (mutagenicity and carcinogenicity). On the other hand, camomile oil or frequently used cinnamon oil exhibit "mutagenesis-deficient" dismutase properties. Essential oils with terpenoids and phenols such as sage or oregano oil, protect the cells from oxidative stress. Because of its antiviral activity, 1,8-cineole is very popular in the treatment of respiratory infections as well as other essential oils with aldehydes that are responsible for the antiviral effect. Lavender oil acts anxiolytically and spasmolytically. As analgesics for centuries are used cloves (eugenol is an active component) and peppermint ((-)-menthol is an active component). Essential oils rich in 1,8-cinneol like oils of the eucalyptus globulus, rosemary, anise, and fennel are used in the treatment of cough because of the action as expectorants and mucolytics. Cumin oil is known for its effect on the digestive system and the suppression of the overgrowth. Citrus oils are used because of their repulsive activity. Many essential oils have application in cosmetics, improve regeneration of the skin, remove scars, give special note to perfumes. Except for cosmetology, today's essential oils are popular as spices and preservatives in the food industry.

Due to many of known effects, essential oils and their major ingredients become important subjects of scientific research and application in everyday life.

Key words: essential, oils**,** composition, biological activity

Thesis contains: 82 pages, 18 figures, 2 tables, 107 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ani Radonić – PhD, associate prof. chair person
2. Vesna Sokol – PhD, associate prof. member
3. Igor Jerković- PhD- full prof. supervisor

Defence date:

Printed and electronic (pdf format) version of the thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Split, Šoltanska 2.

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Eterična ulja 2
1.2. Primjena eteričnih ulja u povijesti 2
1.3. Trenutna primjena eteričnih ulja 3
1.4. Primjena eteričnih ulja u medicini 3
2. Cilj istraživanja 5
3. Materijali i metode 7
3.1. Metode ispitivanja kvalitete eteričnih ulja 8
3.1.1. Europska farmakopeja 8
3.1.2. AFNOR/ISO norme 9
3.1.3. Analiza eteričnih ulja 10
3.2. Metode ispitivanja antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja 11
3.2.1. Opći testovi određivanja antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja 11
3.2.2. Metode za ispitivanje sinergije antibiotika i eteričnih ulja 15
3.3. *In vitro* testovi antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja u hrani 18
3.3.1. Metode 18
3.3.2. Čimbenici koji utječu na aktivnost eteričnih ulja u hrani 19
3.4. Metode ispitivanja antioksidacijske aktivnosti 21
3.4.1. DPPH – metoda 21
3.4.2. FRAP – metoda (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) 22
3.5. Metode određivanja kemijskog sastava 22
3.5.1. Tankoslojna kromatografija, TLC (engl. Thin Layer Chromatography) 23
3.5.2. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, HPLC (engl. High Performance Liquid Chromatography) 24
3.5.3. Vezana tehnika plinska kromatografija-masena spektrometrija , GC-MS (engl. Gas Chromatography–Mass spectrometry) 26
4. Rezultati 28
4.1. Kemijski sastav eteričnih ulja 29
4.1.1. Terpeni 29
4.1.2. Esteri 32
4.1.3. Aldehidi 34
4.1.4. Ketoni 35

4.1.5. Metoksifenoli 36
4.1.6. Cikloeteri (oksidi) 37
4.2. Biološka aktivnost eteričnih ulja 38
4.2.1. Citotoksičnost 38
4.2.2. Fototoksičnost 39
4.2.3. Mutagenost 40
4.2.4. Kancerogenost 42
4.2.5. Antimutagena svojstva eteričnih ulja 43
4.2.6. Antioksidacijsko djelovanje 45
4.2.7. Antimikrobna i antifungalna aktivnost 47
4.2.8. Antivirusno djelovanje 48
4.2.9. Spazmolitičko djelovanje 49
4.2.10. Anksiolitičko djelovanje 50
4.2.11. Analgetsko i protuupalno djelovanje 50
4.2.12. Djelovanje na regeneraciju kože 52
4.2.13. Djelovanje na dišni sustav 53
4.2.14. Djelovanje na probavni sustav 54
4.2.15. Estrogeno djelovanje 55
4.2.16. Insekticidno i repelentno djelovanje 55
4.2.17. Djelovanje na metaboličke puteve 56
5. Rasprava 58
6. Zaključak 62
7. Popis citirane literature 64
8. Sažetak 76
9. Summary 78
10. Životopis 81

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću na pomoći, strpljenju i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala svim prijateljima i studentskim kolegama koji su proteklih 5 godina studiranja učinili zabavnijim i lakšim.

Najveće hvala mojoj obitelji na beskrajnoj podršci i razumijevanju.

I na kraju, hvala mojim roditeljima kojima pripisujem najveću zaslugu za ono što sam postigla. Uvijek ste bili tu za mene i bez vas ovo ne bi bilo moguće.

1. Uvod

1.1. Eterična ulja

Eterična ulja nastaju kao sekundarni metaboliti aromatičnih biljaka. Zbog hlapljivosti eterična ulja se iz biljaka najčešće izoliraju destilacijom. Eterična ulja su tekuća, najčešće nisu obojena, topljiva su u organskim otapalima te su najčešće manje gustoće od vode. Pokazuju baktericidno, virucidno, antiparazitsko, fungicidno, antimikrobno, insekticidno, sedativno, protuupalno djelovanje i dr.. Široko se upotrebljavaju u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i poljoprivrednoj industriji (1). U prirodi, eterična ulja služe biljkama kao zaštita od biljojeda ili za privlačenje željenih kukaca, odnosno odbijanje neželjenih tijekom razdoblja oprašivanja. Biljke koje izlučuju eterična ulja većinom rastu u mediteranskim i tropskim zemljama. Svaki dio biljke može sintetizirati eterično ulje (npr. pupoljci, cvjetovi, lišće), a obično se ulje pohranjuje u sekretorne ili epidermalne stanice te u žlijezde. Sastav i kvaliteta eteričnog ulja ovisi o starosti i podvrsti biljke, organu biljke koji sintetizira ulje, uvjetima okoliša (klima, tlo, vegetacija) te načinu ekstrakcije ulja. Danas je poznato oko 3000 eteričnih ulja, a njih 300-tinjak ima komercijalni značaj. Primjeri eteričnih ulja su: ulje origana *(Origanum vulgare* L.) i timijana *(Thymus vulgaris* L.) koja sadrže karvakrol, timol, γ-terpinen i *p*-cimen (2); ulje cimeta (*Cinnamomum zeylanic* Blume) koje sadrži cimetnu kiselinu i *trans*-cimetni aldehid (3); eugenol je glavna komponenta eteričnog ulja klinčića (*Syzygium aromaticum* L.) (4).

1.2. Primjena eteričnih ulja u povijesti

Eterična ulja najprije su se počela koristiti na istoku. Prvi procesi destilacije provedeni su na Orijentu (Perzija, Indija i Egipat) (5). Podaci o destilaciji koja se radila u davnim vremenima su nejasni i rijetki. Spominje se terpentinsko ulje kao pripravak od strane grčkog povjesničara Herodota (484.-425. god.), rimskog Plinija (23.-79. god.) i njegovog suvremenika Dioscoridesa, autora rasprave "De Materia Medica“ i ono postoji u terapiji 1500 godina. Katalonskom liječniku Arnaldu cle Villanova pripisuje se opis izvorne destilacije eteričnih ulja. Paracelsus von Hohenheim (1493.-1541. god.) u svojoj teoriji navodi da je najsublimiranija tvar koja se dobije destilacijom tzv. *Quinta Essentia*, učinkoviti dio lijeka i da cilj ljekarnika treba biti izolacija i ekstrakcija *Quinta Essentia*. Današnji naziv eterična ulja podsjeća na Paracelsusovu teoriju *Quinta Essentia*. U 16. stoljeću liječnik Brunschwigs iz

Strassburga u svojim djelima detaljno opisuje tehniku destilacije i spominje samo četiri eterična ulja (terpentinsko ulje, ulja ružmarina, drvenog smreka i lavande). Ulje lavande proizvodilo se u Francuskoj i prodavalo po visokoj cijeni. Ljekovitu vrijednost eteričnih ulja opisuje Adam Lonicer u svom djelu "Kriiuterbuch". Napuljski znanstvenik Giovanni Battista della Porta u svom djelu "De Destillatione Libri IX" detaljno opisuje pripremu, tehniku i aparate koji se koriste za dobivanje eteričnih ulja. U 17. stoljeću u ljekarnama se nalazilo 15-20-tak eteričnih ulja. U službenim farmakopejama kao glavna ulja spominju se ulje lavande, terpentinsko ulje i ulje bobica smreke. Razvojem kemije krajem 18. stoljeća, eterična ulja se intenzivnije istražuju. Postupno se povećava korištenje eteričnih ulja u proizvodnji parfema, prehrambenih proizvoda i lijekova (6).

1.3. Trenutna primjena eteričnih ulja

Eterična ulja se najviše koriste u prehrambenoj industriji i u parfemima. Značajna je primjena eteričnih ulja u aromaterapiji. Zbog svojih antibakterijskih svojstava koriste se kao antiseptici, stomatološki preparati ili hrana za stoku. U prehrambenoj industriji osim kao arome, eterična ulja se primjenjuju i kao konzervansi. Na području Europske unije postoji nekoliko konzervansa na bazi eteričnih ulja koji su komercijalno dostupni. "DMC Base Natural" je konzervans španjolske tvrtke DOMCA i sadrži eterično ulje ružmarina, kadulje i citrusa te glicerol. Istraživanjem na agaru, "DMC Base Natural" konzervans pokazao je učinkovitost protiv Gram-pozitivnih, a u većim koncentracijama i Gram-negativnih bakterija. Na španjolskom mekom siru u koncentraciji od 2500 ppm "DMC Base Natural" sprječava razvoj *Listeria monocytogenes*, ali ne i *Escherichia coli* (7).

1.4. Primjena eteričnih ulja u medicini

Svojstvo citotoksičnosti temeljeno na peroksidativnoj aktivnosti čini eterična ulja dobrim antiseptičkim i antimikrobnim sredstvima. Mogu se primjenjivati za pročišćavanje zraka, osobnu higijenu, posebice oralnu, ali i za očuvanje hrane i usjeva (insekticidno

djelovanje). Mali rizik od genotoksičnosti prednost je primjene eteričnih ulja kao i dobra antimutagenska i antikancerogena svojstva koja određena ulja pokazuju. Eterična ulja, odnosno njihovi pojedini sastojci kao, npr. fenoli, svojom prooksidacijskom aktivnošću smanjuju proliferaciju tumorskih stanica, volumen tumora ili djeluju nekrotički (1). Neka ulja se koriste u medicinske svrhe, za liječenje ili ispravljanje disfunkcija organa ili organizma (8). Eugenol iz eteričnog ulja *Eugenia caryophyllata* L. potiče apoptozu u stanicama humanih promijelocitnih leukemija (HLG-60) putem ROS-a (eng. Reactive Oxygen Species, ioni ili vrlo male molekule uključujući ione kisika, peroksida i slobodne radikale koji su vrlo reaktivni zbog prisutnosti nesparenih elektrona) (9). Eterično ulje *Myrica gale* L. i *Croton flavers* L. djeluju antikancerogeno na staničnu liniju A-549 karcinoma pluća i staničnu liniju DLD-1 adenokarcinoma debelog crijeva (10,11). Geraniol inhibira timidilat-sintazu i ekspresiju timidin-kinaze u stanicama karcinoma debelog crijeva te smanjuje volumen karcinoma (12). Eterična ulja utječu na funkciju mitohondrija čija je prozvodnja u tumorskim stanicama povećana što dovodi do povećanog stvaranja oksidativnog stresa (13). Eterična ulja zbog svojih antikancerogenih i prooksidacijskih svojstava mogla bi postati dio moderne medicinske domene.

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je sustavni pregled znanstvenih članaka i literature o kemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti eteričnih ulja. Iz prikupljenih podataka potrebno je prikazati metode određivanja kemijskog sastava eteričnih ulja i metode određivanja biološke aktivnosti eteričnih ulja. Rezultati prikazuju biološke učinke eteričnih i njihovu terapijsku primjenu.

3. Materijali i metode

3.1. Metode ispitivanja kvalitete eteričnih ulja

Kvalitetu eteričnih ulja propisuje niz normi, a glavni izvori tih normi su Europska farmakopeja i AFNOR (Association Française de Normalisation)/ISO (International Organization for Standardization) norme (14).

3.1.1. Europska farmakopeja

Europska farmakopeja sadrži monografije pojedinih eteričnih ulja, monografije za ispitivanje kvalitete eteričnih ulja i zahtjeve za kakvoću.

Norma *Aetherola* 01/2018:2098 navodi eterično ulje kao mirisni proizvod, najčešće složenog sastava, dobiveno destilacijom iz biljnog materijala ili mehaničkim postupcima bez zagrijavanja (tiještenjem). Osim čistih ulja, eterično ulje prema farmakopeji može biti:

1. **deterpenirano** – eterično ulje kojem su uklonjeni (djelomično ili potpuno) monoterpenski ugljikovodici (C_{10}-spojevi),
2. **deterpenirano i deseskviterpenirano** - eterično ulje kojem su uklonjeni (djelomično ili potpuno) monoterpenski i seskviterpenski ugljikovodici (C_{15}-spojevi),
3. **rektificirano** - eterično ulje koje je podvrgnuto frakcijskoj destilaciji kako bi konačni proizvod bio obogaćen ili osiromašen određenim spojevima,
4. **x-free** - eterično ulje kojemu je uklonjena jedna specifična komponenta (14).

Ispitivanja eteričnih ulja

Za eterična ulja potrebna su prema Farmakopeji sljedeća ispitivanja:

Opći testovi

1. *Relativna gustoća* sukladno poglavlju 2.2.5.
2. *Indeks loma svjetla* sukladno poglavlju 2.2.6.
3. *Optička rotacija* sukladno poglavlju 2.2.7.
4. *Masne kiseline* sukladno poglavlju 2.8.7.

Dodatni testovi

1. *Točka zaleđivanja* sukladno poglavlju 2.2.18.
2. *Kiselinski broj* sukladno poglavlju 2.5.1.
3. *Peroksidni broj* sukladno poglavlju 2.5.5.
4. *Strani esteri* sukladno poglavlju 2.8.6.
5. *Ostatak nakon sušenja* sukladno poglavlju 2.8.9.
6. *Voda* sukladno poglavlju 2.8.5.
7. *Otapanje u alkoholu* sukladno poglavlju 2.8.10.
8. *Falsifikacija* – utvrđivanje mogućih patvorenja (*Tankoslojna kromatografija* sukladno poglavlju 2.2.27, *Plinska kromatografija* sukladno poglavlju 2.2.28, kiralna kromatografija ili druge odgovarajuće tehnike) (14).

Čuvanje i označavanje

Farmakopeja nalaže čuvanje u napunjenim spremnicima, bez pristupa zraka i zaštićeno od utjecaja svjetla. Eterično ulje mora biti označeno na sljedeći način:

1. znanstvenim nazivom biljke iz koje je ulje izolirano
2. primjena eteričnog ulja
3. tip ili kemotip
4. način proizvodnje
5. dodatak konzervansa i u kojoj koncentraciji
6. dodatak antioksidansa
7. dodatni postupci u obradi koji nisu navedeni u samoj definiciji eteričnog ulja (14).

3.1.2. AFNOR/ISO norme

AFNOR (*Association Française de Normalisation*, Francusko udruženje za normizaciju) i ISO (International Organization for Standardization) su dvije organizacije kojima je cilj ujednačiti podatke te dati smjernice za laboratorijske analize, postupke u procesima

proizvodnje i kontrole kvalitete te zahtjeve kvalitete. To uključuje i norme za eterična ulja koja su slična onima iz farmakopeje. Norme za eterična ulja su podijeljene u dva dijela:

1. opće norme (obilježavanje, uzorkovanje i pojedinačne metode analize npr. određivanje gustoće, indeksa loma svjetlosti)
2. pojedinačne norme (zahtjev kvalitete za pojedinačna eteričnih ulja) (14).

3.1.3. Analiza eteričnih ulja

- Relativna gustoća - dobra „screening metoda“ kojom se određuje relativna gustoća u odnosu na vodu. Njenom uporabom mogu se dokazati neke grupe patvorina kao što su dodane sintetske tvari, biljna ulja ili organska otapala.
- Mješivost sa smjesama etanola i vode - neka se eterična ulja otapaju u točno određenim omjerima sa 70% ili 80%-tnim etanolom. Na ovaj način mogu se otkriti grube patvorine. Iako je ovo stara tehnika, vrlo je korisna te je danas propisana u AFNOR/ISO normama.
- Optička rotacija - ovom metodom se određuje zakretanje polarizirane svjetlosti u eteričnim uljim čije glavne komponente sadrže kiralne molekule. Na primjer, ulje lavande sadrži *R*-linalool, a eterično ulje korijandera sadrži *S*-linalool. *S*- i *R*-linalool razlikuju se u optičkoj rotaciji te se patvorenjem jednog eteričnog ulja drugim lako dokazuje zbog promjene optičke rotacije koja se uslijed toga pojavljuje.
- Peroksidni broj - analiza peroksida koji nastaju spontanom oksidacijom molekula eteričnih ulja na zraku. Koristi se za otkrivanje ulja koja su predugo ili neodgovarajuće skladištena.
- Određivanje ukupnih estera (indeks estera) - provodi se na eteričnim uljima koja su bogata esterima s ciljem otkrivanja patvorine.
- Kiselinski indeks - utvrđuje prisutne slobodne kiseline u ulju, a ima vrlo malu važnost u otkrivanju patvorina.
- Određivanje ukupnih karbonila – analiza za određivanje ukupnih karbonila reakcijom s hidroksilaminom u uljima bogatim karbonilnim spojevima (aldehidi, ketoni, esteri), samostalno je metoda neznačajna zbog čega se mora raditi zajedno s drugim analizama.

- Određivanje suhog ostatka nakon uparivanja - eterična ulja dobivena destilacijom vodenom parom imaju vrlo nizak ostatak nakon uparivanja za razliku od ulja dobivenih prešanjem usplođa (citrusi). Ako eterično ulje usplođa citrusa ima nizak suhi ostatak vjerojatno se radi o patvorenju destiliranim uljem ili sintetskim limonenom.
- Određivanje apsorbancije - eteričnim uljima određuje se sposobnost apsorpcije energije elektromagnetskog zračenja u rasponu od 220 do 440 nm. Ova analiza se koristi kod eteričnih ulja usplođa citrusa koja sadrže kumarine koji apsorbiraju energiju tih valnih duljina. Niska apsorbancija ukazuje na patvorenje destiliranim uljima.
- Određivanje točke ledišta – neprecizna metoda kojom se otkrivaju patvorine eteričnih ulja kojima je dodan etanol (snižava točku ledišta).
- Određivanje karotenoida - provodi se najčešće u ispitivanju eteričnog ulja naranče, a ako je sadržaj karotenoida nizak postoji mogućnost patvorenja sa sintetskim otapalima.
- Tankoslojna kromatografija - vrlo korištena metoda u farmakognoziji za određivanje identiteta, kemijskog sastava i glavne komponente eteričnog ulja.
- Plinska kromatografija - instrumentna tehnika pomoću koje se određuju udjeli pojedinih komponenti u eteričnom ulju. Najvažnija je metoda otkrivanja patvorina (14).

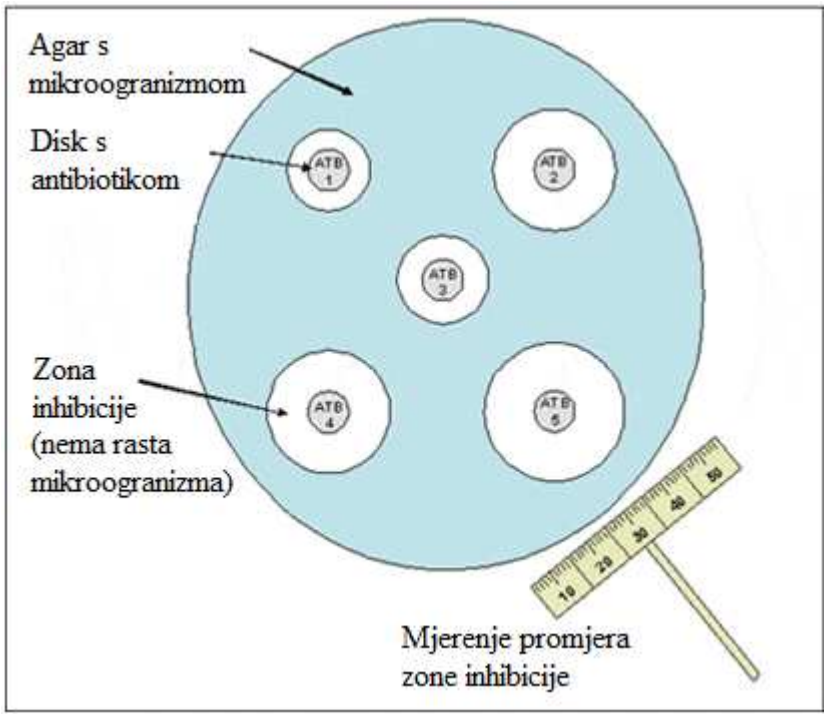
3.2. Metode ispitivanja antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja

3.2.1. Opći testovi određivanja antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja

Osnovna metoda za ispitivanje osjetljivosti mikroorganizma na antibiotike je antibiogram. Standardizirana koncentracija mikroorganizma (bakterije, gljivice, virusi) izlaže se specifičnim koncentracijama antibiotika s ciljem određivanja osjetljivosti na jedan lijek i predviđanja osjetljivosti na slične. Primjenom antibiograma ne može se predvidjeti ishod liječenja budući da je test *in vitro* i mnogi čimbenici koji djeluju *in vivo* se zanemaruju (npr.

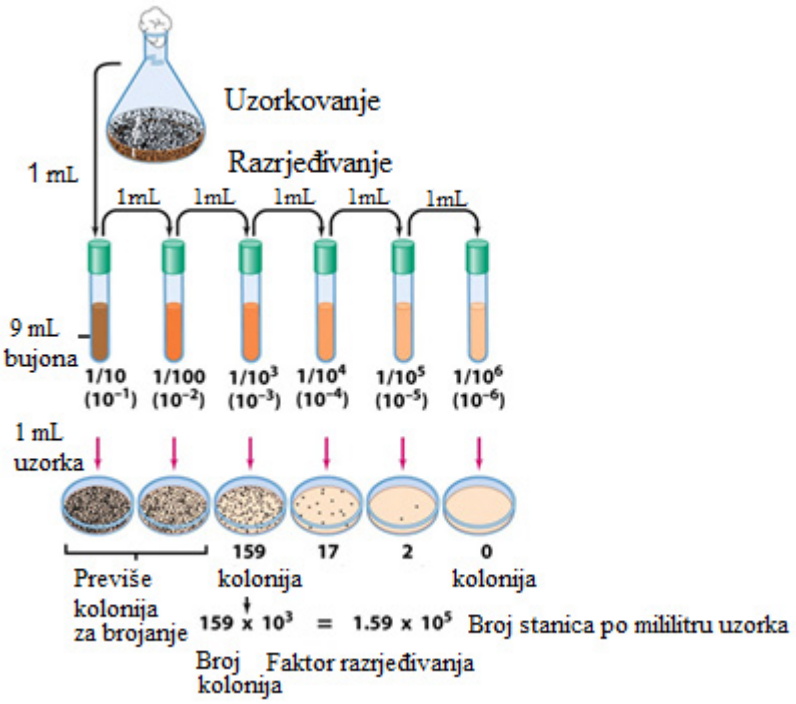
farmakodinamika, stanje imunološkog sustava domaćina i dr.). Metode ispitivanja osjetljivosti mikroorganizama mogu biti kvalitativne, semikvantitativne i metode na osnovi nukleinskih kiselina (15).

Najpoznatija kvalitativna metoda je difuzija na disku. U ovoj metodi se disk natopljen antibiotikom stavlja na podlogu od agara s inokuliranim mikroorganizmom čija se osjetljivost ispituje. Nakon inkubacije koja traje 16 do 18 sati, mjeri se promjer zone inhibicije oko svakog diska. Ovisno o veličini promjera kombinacija antibiotika i mirkoorganizma može se označiti s S, R ili I. Oznaka S (susceptible) predstavlja osjetljivost mikroorganizma na antibiotik, R (resistant) otpornost ili I (intermediate) srednju osjetljivost. U usporedbi s kvantitativnim metodama, kvalitativne su manje precizne (15).



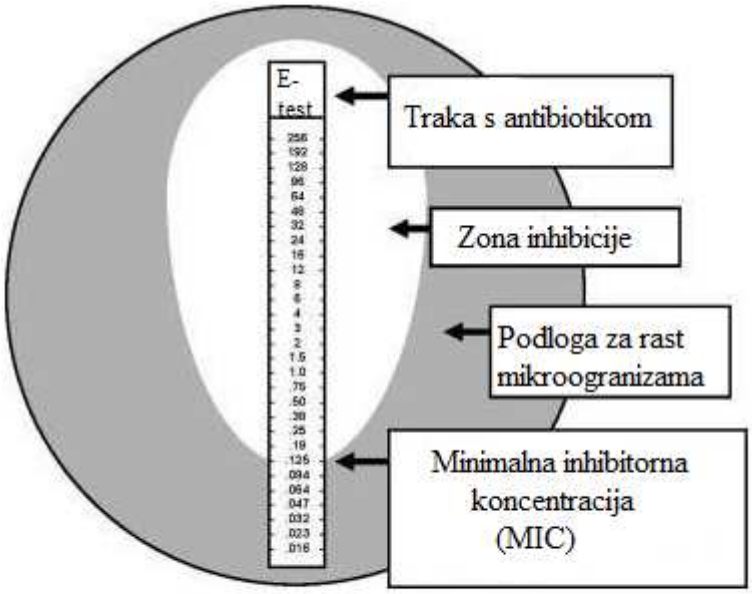
Slika 1. Određivanje antimikrobne aktivnosti – metoda difuzije na disku [pristupljeno: 18.9.2018.] Dostupno na: https://www.google.hr/search?biw=1366&bih=613&tbm=isch&sa=1&ei=xMegW_WaN4TikgX4iIToCA&q=antibiogram+disk+difusion&oq=antibiogram+disk+difusion&gs_l=img.3...108271.111945.0.112331.14.13.0.1.1.0.116.1159.12j1.13.0....0...1c.1.64.img..0.4.300...0i19k1j0i24k1.0.vG1hJ4dG87E#imgrc=QjYC2JJHOFnr8M:

Semikvantitativne metode određuju MIK (minimalna inhibitorna koncentracija, minimalna koncentracija koja *in vitro* inhibira rast željenog mikroorganizma). MIK je brojčana vrijednost koja se može tumačiti kao S (osjetljiv), R (otporan) ili I (srednje osjetljiv). MIK se najviše određuje za bakterije (uključujući anaerobne i mikobakterije), ali se može koristiti i za gljivice. Moguće je i određivanje MBK (minimalne ubojite (baktericidne) koncentracije). Metoda razrjeđivanja bujonom predstavlja zlatni standard. Antibiotik se razrjeđuje bujonom ili agarom (serijsko, dvostruko razrjeđenje) te se inokulira u mikroorganizam. Nakon inkubacije od 18 do 24 sata promatraju se promjene u bujonu ili agaru. Prva koncentracija antimikrobnog sredstva pri kojoj nije došlo do porasta mikroorgranizma na agaru ili je bujon ostao bistar predstavlja MIK. MIK se izražava u g/mL. Ova metoda zahtijeva mnogo vremena budući da se po epruveti može testirati jedan lijek (15).



Slika 2. Određivanje antimikrobne aktivnosti – metoda dilucije. [pristupljeno: 10.9.2018.] Dostupno na: https://www.google.hr/search?biw=1366&bih=613&tbm=isch&sa=1&ei=bnmWW_HDOaz1qwGqzI3wDQ&q=serial+dilution+method+in+microbiology&oq=dilution+metho&gs_l=img.3.8.0i19k1l2j0i5i30i19k1l8.1806.6523.0.11255.18.14.2.2.2.0.227.1709.3j9j2.14.0....0...1c.1.64.img..0.17.1511...0j0i8i30i19k1.0.Ru0uNPwEQdw#imgrc=RSJRGN0G7Ook1M:

Brža metoda naziva se E-test, a temelji se na primjeni poliesterske trake impregnirane antibiotikom. Duž trake koncentracijski gradijent antibiotika raste. Podloga od agara sadrži inokuliran mikroorganizam te se na nju polaže traka. MIK se očitava s mjesta na traci gdje započinje inhibicija, a prednost ove metode je što se može ispitati više antibiotika na jednoj podlozi (15).



Slika 3. Određivanje antimikrobne aktivnosti – E-test. [pristupljeno: 18.9.2018.] Dostupno na: https://www.google.hr/search?q=e+test&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwigkLOutcTdAhWlqIsKHdf9B1EQ_AUICigB&biw=1366&bih=613#imgrc=6PGfK9o74sxOLM:

Metode na osnovi nukleinskih kiselina obuhvaćaju testove kojima se otkrivaju geni za otpornost ili mutacije. Primjerice, *Staphylococcus aureus* sadrži gen za otpornost na oksacilin (*mecA*). Ako postoji taj gen, smatra se da je *Staphylococcus aureus* otporan na sve β-laktamske antibiotike. Pronalazak gena za otpornost ne znači nužno i otpornost *in vivo*, stoga je primjena ovih testova ograničena i nije zamijenila standardnu primjenu antibiograma.

3.2.2. Metode za ispitivanje sinergije antibiotika i eteričnih ulja

Postoje različite metode koje se koriste za ispitivanje interakcija odnosno sinergije između antibiotika i eteričnih ulja. Poželjno je da metoda za *in vitro* ispitivanje bude jednostavna za izvođenje, točna i reproducibilna te da se može primijeniti u kliničkoj praksi. Metode Time-kill i Checkerboard su najčešće korištene metode za ispitivanje sinergije iako su dugotrajne i radno zahtjevne. Metoda E-testa je tehnički zahtjevnija od prethodne dvije metode, a nije toliko dobra za ispitivanje sinergizma (16). Interakcija između eteričnih ulja i antibiotika može biti aditivna, sinergistička ili antagonistička. Ako je učinak kombinacije jednak algebarskom zbroju njihovih pojedinačnih učinaka, tada se radi o aditivnoj interakciji. Ako je učinak kombinacije veći od njihovih pojedinačnih učinaka, tada je prisutan sinergizam, odnosno ako je manji, antagonizam (17).

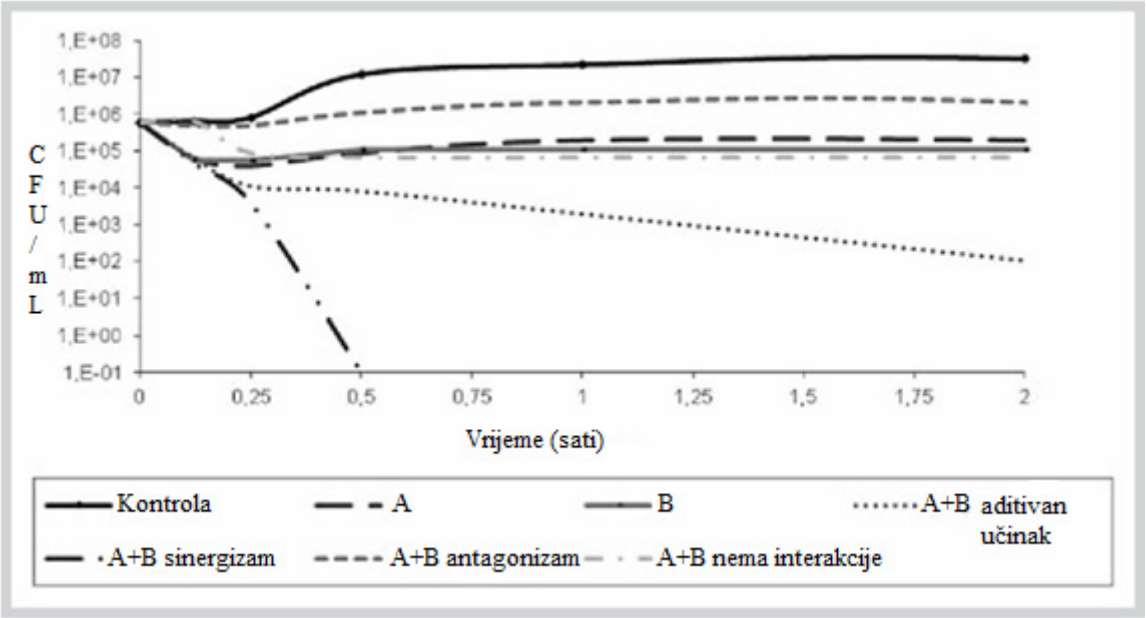
3.2.2.1. Metoda Checkerboarda

Metoda Checkerboarda je najčešća *in vitro* tehnika koja se koristi za ispitivanje sinergije između pojedinih antimikrobnih tvari. Koristi se mikrotitarska pločica s čije se vertikalne strane nanosi jedna tvar, a s horizontalne druga. Raspon koncentracija koje se nanose okružuju željenu minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC). Mjerenja se izvode u jednom trenutku stoga se antimikrobnom sredstvu ne može odrediti djelovanje u dužem periodu (18). Rezultati dobiveni metodom Checkerboarda tumače se izradom izobolograma ili izračunavanjem FIC indeksa za dva antimikrobna lijeka (16,17). Ako je FIC indeks 0,5 ili manji tada je učinak dvije antimikrobne tvari sinergistički, a ako je između 0,5 i 1 tada je aditivan učinak. FIC indeks veći od 2 predstavlja antagonizam (u nekim studijama veći od 4) (16).

3.2.2.2. Time-kill metoda

Time-kill metoda mjeri broj održivih bakterija u tekućem mediju uz dodatak kombinacije antimikrobnih tvari u različito vrijeme. Dobivene krivulje kao rezultat ove metode nisu široko korištene u određivanju interakcije dva antimikrobna lijeka, ali su korisne

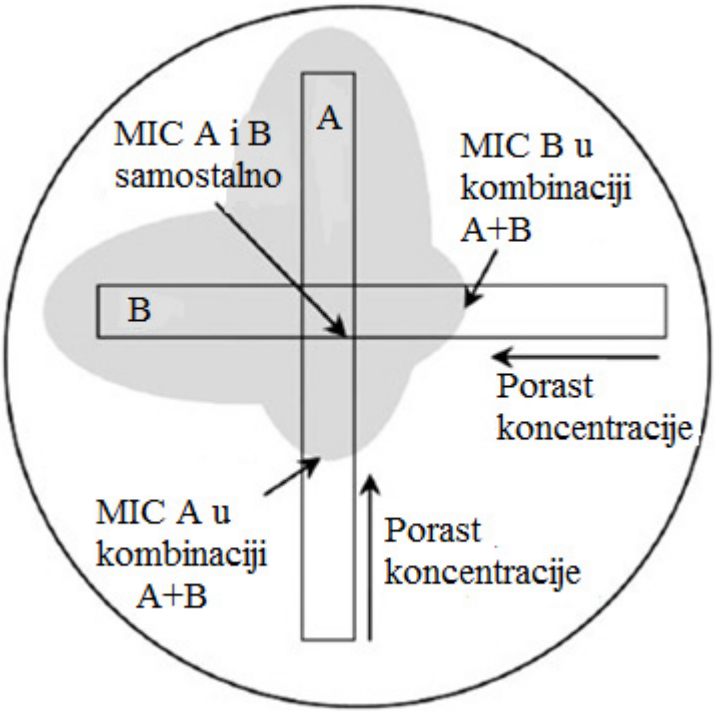
za određivanje željene koncentracije na mjestu infekcije (18). Kako se koncentracija mjeri u mnogo vremenskih točaka, krivulja zahtjeva mnogo rada, a koncentracije i kombinacije koje se mogu na ovaj način testirati su ograničene (16).



Slika 4. Time-kill metoda. [pristupljeno: 15.5.2018.] Dostupno na: https://www.researchgate.net/figure/Time-kill-method-of-interpreting-interactions-when-two-samples-are-combined_fig1_49800936

3.2.2.3. E- test

Metoda E-test se manje primjenjuje u odnosu na Time-kill metodu i metodu Checkerboard iako se jednostavnije izvodi. U E-testu primjenjuju se dvije plastične trake obložene dvama antimikrobnim sredstvima (koncentracija graduirano raste) postavljene na agar s odgovarajućom bakterijskom kulturom. Trake su ukrižene pod kutem od 90°. Mjesto presijecanja predstavlja MIC kombinacije antimikrobnih sredstava (16). Ako kombinacija antimikrobnih sredstava djeluje sinergistički, rast bakterija bit će inhibiran u donjem desnom kvadrantu. Inhibiran rast u gornjem lijevom kvadrantu ukazuje da je učinak kombinacije antimikrobnih sredstava antagonistički (18).



Slika 5. E-test. [pristupljeno: 15.5.2018.] Dostupno na: https://www.google.hr/search?q=E+Test&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjrppfkzrDdAhXmkIsKHXGGBeMQ_AUICigB&biw=1366&bih=613#imgrc=skvZb4PosAhZxM:

3.2.2.4. Ostale metode

Metode Checkerboard, Time-kill i E- test oslanjaju se na krajnju točku postignutu nakon 24 sata inkubacije. Za dobivanje rezultata u stvarnom vremenu koriste se druge metode. Jedna od metoda uključuje primjenu zelene fluorescencije proteina luciferaze (19). Druga metoda za analizu interakcija radiometrijski prati bakterijski rast kao funkciju otpuštanja CO_2 pri čemu se koristi obilježen 14-C atom iz metabolizma palmitata. Za određivanje vrste interakcije koriste se indeks rasta i " x/y " kvocijent. Ako je " x/y " kvocijent manji od 0,5 tada dva antimikrobna sredstva djeluju sinergistički. Vrijednost kvocijenta 1 označava aditivan učinak, a veća od 2 antagonizam (20). Pojedine studije

uspoređuju MIC antibiotika samostalno i uz dodatak potencijalnog sinergista (21). Sinergistički učinak kombinacije antimikrobnih tvari je postignut ako je rast (optička gustoća na 600 nm) suspenzije bakterije manji nego nakon inkubacije s pojedinačnom antimikrobnom tvari (22).

3.3. *In vitro* testovi antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja u hrani

3.3.1. Metode

Za proučavanje antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja koriste se metoda difuzije i metoda razrjeđenja. Na metodama su napravljene izmjene budući da mnogi čimbenici kao što su sastav sredstava za kulturu, testirani mikroorganizmi, metoda ekstrakcije, pH i drugi čimbenici mogu značajno utjecati na rezultate. Uz navedene metode, kao treća se primjenjuje bioautografija. Rezultati ovise o tehnikama koje se koriste i o parametrima (23).

Micro-Media Systems (MMS) su razvili postupak izrade posuda s antimikrobnim sredstvima koje se koriste za postupak mikrorazrijeđenja u kliničkim laboratorijima. Prije upotrebe posudice se izvade iz zamrzivača, otope i inokuliraju inokulomom koji se koristi i za druge testove osjetljivosti. Minimalna inhibitorna koncentracija određena ovom metodom slična je onoj određenoj standardnom tehnikom (metoda dilucije) (24). Kao glavna mjera antibakterijskog učinka eteričnih ulja koristi se minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Ponekad se umjesto MIC, koriste minimalna baktericidna koncentracija ili minimalna bakteriostatska koncentracija. Iako još ne postoje standardni testovi za ispitivanje primjene eteričnih ulja u prehrambenoj industriji kao konzervansa ili začina, postoji velika potreba za njihovim razvojem. Najčešće korištene tehnike navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Metode proučavanja antimikrobne aktivnosti (26).

Svrha	Metoda
Screening antibakterijske aktivnosti	Disk difuzija
Određivanje antibakterijske snage	Dilucija na agaru Razrjeđivanje bujona (optički rast, optička

	gustoća/zamućenost, apsorbancija, kolorimetrija, provodnost/vodljivost/impedancija, održiv broj)
Određivanje trajanja i brzine antimikrobne aktivnosti	Time-kill metoda Krivulja preživljavanja
Promatranje fizičkog učinka antimikrobne aktivnosti	Mikroskopiranje (elektronski mikroskop)

3.3.2. Čimbenici koji utječu na aktivnost eteričnih ulja u hrani

Broj komercijalno dostupnih konzervansa koji sadrže eterična ulja se povećava. *In vitro* istraživanja pokazala su kako je potrebna veća koncentracija eteričnih ulja u hrani nego u antibakterijskim testovima za postizanje istog učinka. Udio masti, proteina, soli i vode u hrani utječe na otpornost mikroogranizama. Fenolni spojevi (koji sadrže hidroksilnu skupinu) kao timol, eugenol i karvakrol pokazali su dobro antimikrobno djelovanje. Navedeni spojevi su komponente začina klinčića, cimeta, kadulje ili origana (25). Sniženjem pH vrijednosti povećava se hidrofobnost eteričnih ulja što im omogućuje lakše otapanje u lipidima i prolaz kroz lipidnu membranu bakterije. Veći udio masti ili bjelančevina u hrani ili niži sadržaj vode mogu smanjiti djelovanja eteričnih ulja kao konzervansa. Sadržaj ugljikohidrata u hrani nije toliko značajan za djelovanje eteričnih ulja. Oblik hrane također utječe na djelovanje eteričnih ulja. Primjerice, bolji će učinak ostvariti u juhi nego u gelu zbog strukture gela koja predstavlja ograničenje u difuziji eteričnog ulja. Ambalaža hrane, vakuum ili prisutnost zraka, temperatura, ali i sama vrsta mikroorganizma utječu na njegovu osjetljivost odnosno antimikrobno djelovanje eteričnog ulja (26). U tablici 2. su navedene bakterije koje se prenose hranom i koncentracija eteričnih ulja (ili njihove glavne komponente) koja je potrebna za ostvarivanje antimikrobnog učinka.

Tablica 2. MIC eteričnih ulja ili njihovih komponenti u *in vitro* testovima za bakterije koje se prenose hranom (26).

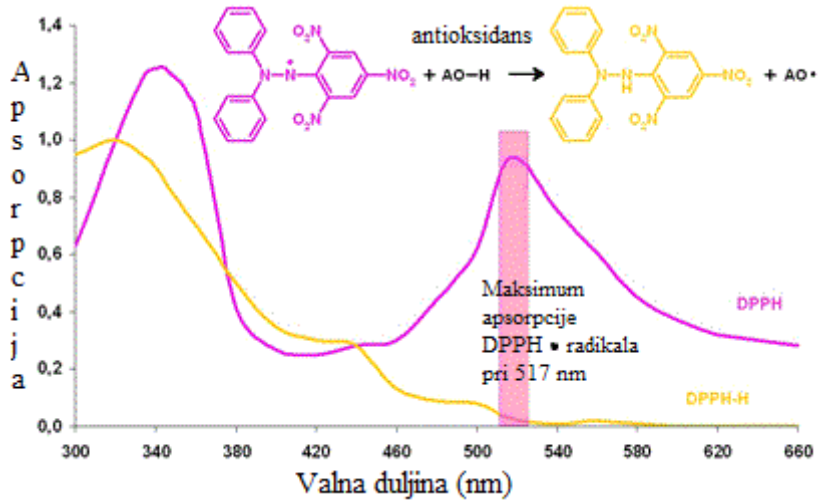
Biljka/eterično ulje/sastojak	Vrsta bakterija	MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) / μL mL^{-1}
Ružmarin	*Escherichia coli*	4.5 - □10
	Salmonella typhimurium	>20
	Bacillus cereus	0.2
	Staphylococcus aureus	0.4 – 10
	Listeria monocytogenes	0.2
Origano	*Escherichia coli*	0.5 – 1.2
	Salmonella typhimurium	1.2
	Staphylococcus aureus	0.5 – 1.2
Kurkuma	*Escherichia coli*	□0.2
	Bacillus cereus	0.2
Karvakrol	*Escherichia coli*	0.225 – 5
	Salmonella typhimurium	0.225. - 0.25
	Staphylococcus aureus	0.175 – 0.450
	Listeria monocytogenes	0.375 – 5
Timol	*Esherichia coli*	0.225 – 0.45
	Sakmonella typhimurium	0.056
	Staphylococcus aureus	0.140-0.225
	Listeria monocytogenes	0.450
	Bacillus cereus	0.450
Eugenol	*Escherichia coli*	1.0
	Salmonella typhimurium	0.5
	Listeria monocytogenes	□1.0

3.4. Metode ispitivanja antioksidacijske aktivnosti

U ispitivanju antioksidacijske aktivnosti eteričnih ulja koriste se različite metode.

3.4.1. DPPH – metoda

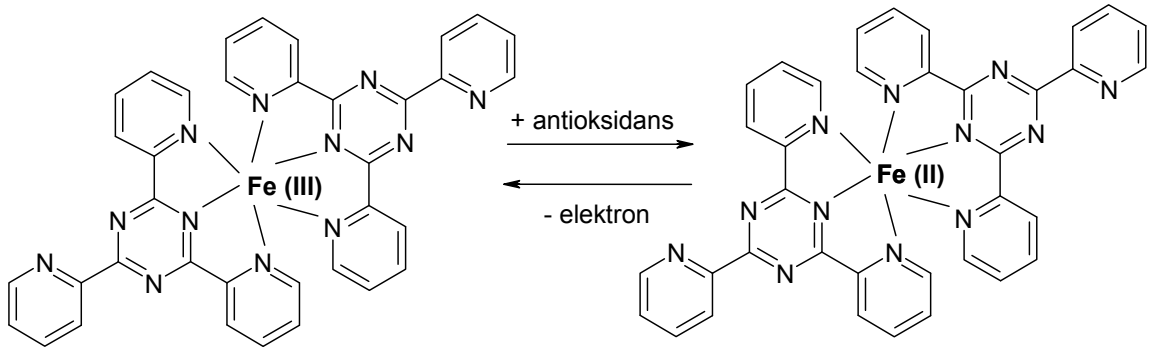
DPPH metoda je najčešće korištena *in vitro* metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Zasniva se na redukciji DPPH• radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini uz popratnu kolorimetrijsku reakciju. DPPH• je stabilan slobodni radikal, sadrži slobodan delokalizirani elektron. Taj delokalizirani elektron određuje apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) s maksimumom oko 520 nm. Prilikom reakcije DPPH• s donorom elektrona (antioksidans), on prelazi u svoj molekularni, reducirani oblik DPPH uz nestanak ljubičaste boje. Apsorbancija se linearno smanjuje ovisno o koncentraciji antioksidansa (27, 28).



Slika 6. Redukcija DPPH • antioksidansom (27).

3.4.2. FRAP – metoda (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power)

Ova kolorimetrijska metoda temelji se na redukciji žuto obojenog složenog iona TPTZ (željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazin) pomoću antioksidansa. Pri 593 nm uslijed vezanja fero oblika (Fe^{2+}) na ligand nastaje plavo obojen produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju (pH=3,6) kako bi se očuvala topljivost željeza i povećao redoks potencijal. Mjerenjem apsorbancije određuje se količina reduciranog željeza koja kolerira s količinom antioksidansa. Kao referentni spojevi koriste se trolox ili askorbinska kiselina (28, 29).



Slika 7. FRAP metoda, redukcija željezo-2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ) s antioksidansom (29).

3.5. Metode određivanja kemijskog sastava

Tvari koje se nalaze u prirodi pa tako i eterična ulja najčešće se pojavljuju kao kompleksne smjese. Klasičnim metodama odjeljivanja (kristalizacija, sublimacija, ekstrakcija, destilacija) donekle se mogu izdvojiti pojedine komponente iz smjese. Problem predstavljaju molekule koje se javljaju kao konstitutivni izomeri ili stereomeri. Taj problem riješen je primjenom kromatografije koja danas pripada skupini suvremenih metoda koje omogućuju karakterizaciju velikog broja uzoraka u kratkom vremenu.

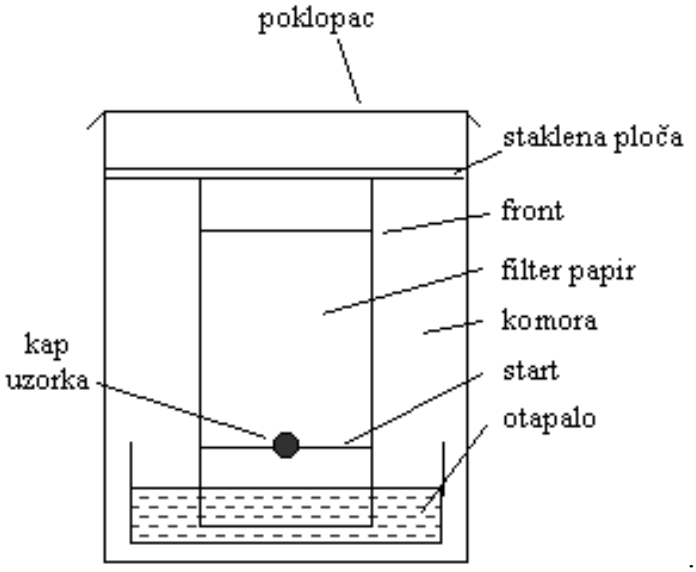
Naziv kromatografija potječe od ruskog kemičara Tswett-a. On je ovu tehniku 1906. god. koristio za odjeljivanje biljnih boja, a kasnije se ime prenijelo na sve postupke odjeljivanja u kojima se primjenjuju stacionarna i mobilna faza. Definiciju ove tehnike postavio je Keulemans i ona glasi : „Kromatografija je metoda odjeljivanja kojom se komponente razdjeljuju između dviju faza; jedna je stacionarna s velikom površinom, a druga je mobilna.“

Stacionarna faza je krutina ili kapljevina, a mobilna kapljevina ili plin. Pod utjecajem sile teže, razlike u tlakovima ili kapilarne sile mobilna faza putuje uzduž ili preko stacionarne faze. Kromatografija se temelji na uspostavljanju dinamičke ravnoteže. Dio tvari koji je u stacionarnoj fazi nalazi se u ravnoteži s dijelom iz mobilne faze. Gibanje mobilne faze narušava ravnotežu pa se molekule kreću u smjeru gibanja mobilne faze. Različiti spojevi imaju specifične interakcije sa stacionarnom i mobilnom fazom zbog čega putuju različitim brzinama i tako se odvajaju. Odjeljivanje se temelji na adsorpciji, razdjeljenju, difuziji, ionskoj izmijeni, kiralnosti i dr. Dobra razlučivost kromatografije temelji se na uzastopnim ponavljanjima primarnog postupka razdjeljivanja tvari između stacionarne i mobilne faze, a zbog neprestanog uspostavljanja ravnoteže odjeljivanje je vrlo učinkovito. Uspješnost kromatografije ovisi o prirodi tvari, stacionarnoj i mobilnoj fazi, brzini mobilne faze, temperaturi sustava, omjeru mase tvari koja se odjeljuje i stacionarne faze, veličini i obliku čestica sorbensa (stacionarna faza) i dr. (30).

3.5.1. Tankoslojna kromatografija, TLC (engl. Thin Layer Chromatography)

Kod tankoslojne kromatografije odjeljivanje se temelji na adsorpciji ili razdjeljenju. Najčešće se koristi adsorpcijska kromatografija. Tanki sloj adsorbensa (stacionarna faza) nanosi se na staklenu pločicu. Debljina adsorbensa ovisi o namjeni kromatografije, a najčešće se koriste silikagel, aluminijev oksid i dr. Najjednostavnija izvedba je tzv. "uzlazna kromatografija". Pomoću tankoslojne kromatografije može se odrediti broj komponenti u smjesi, pratiti reakciju (nestajanje reaktanata i nastajanje produkata), odrediti najpogodnije otapalo za kromatografiju na stupcu i dr. Osnovne faze rada su nanošenje uzorka, razvijanje i obrada kromatograma.

Spojevi se identificiraju pomoću pokretljivosti na tankom sloju, a ona se izračunava pomoću R_F vrijednosti, omjer prijeđenog puta tvari (x) i prijeđenog puta otapala (y): $R_F = x / y$ (30).



Slika 8. Tankoslojna kromatografija (TLC). [pristupljeno: 20.05.2018.] Dostupno na: https://www.google.hr/search?q=tlc+kromatografija&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi3mryv8_vbAhWB-qQKHauMD3IQ_AUICigB&biw=1366&bih=651#imgrc=a9fgdqdiVhh72M

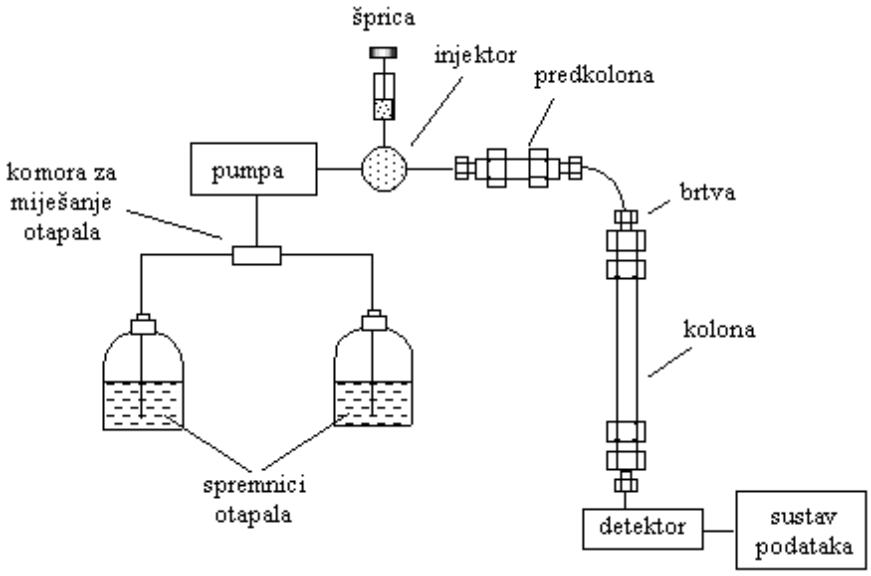
3.5.2. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, HPLC (engl. High Performance Liquid Chromatography)

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti danas je jedna od najrazvijenijih kromatografija. Koristi se za odjeljivanje i određivanje polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutsko-biokemijskoj praksi, forenzici, industriji, u ispitivanjima hrane, zraka, otpadnih voda na prisustvo i sadržaj štetnih tvari, za odjeljivanje alkana, lipida, steroida, šećera, vitamina i dr. Osnovni dijelovi HPLC-a su: kolona, crpka koja pokreće mobilnu fazu kroz

kolonu, spremnik(ci) mobilne faze i sustav za obradu otapala, sustav za unošenje uzorka (injektor), detektor s pisačem, integratorom i računalom.

Otapala koja se koriste kao mobilna faza moraju biti visoke čistoće i bez otopljenih plinova ili suspendiranih čestica (uklanjanje npr. pomoću mikroporoznih filtera pod vakuumom). Crpka za ubacivanje mobilne faze u kolonu radi pod tlakom do 15 MPa i brzinom od 0,1 do 10 mL min^{-1}. Pomoću mikrolitarske šprice ili "autosamplerom" uzorak se unosi u sustav za injektiranje (petlju) u kojem se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te nosi uzorak na kolonu. Ispred analitičke kolone mogu se postaviti kraće predkolone ili predkolonski filteri kojima će se moguća onečišćenja ukloniti. Te su kolone kraće od analitičkih, ali su obično punjene istim materijalom. Kolona je najčešće cijev izrađena od nehrđajućeg čelika, duljine 10-30 cm, unutrašnjeg promjera 4-10 mm, s punilima (čestice promjera 5-8 μm). Kao nosač tekuće nepokretne faze najčešće je prisutan silikagel prevučen tankim organskim slojem kojim se kemijski ili fizikalno veže za površinu punila.

Detektori mogu pratiti karakteristike otopljene tvari ili pokretne faze. Ako se prate karakteristike otopljene tvari onda se mjeri apsorpcija u UV/VIS ili IR području, fluorescencija ili struja na elektrodi. Indeks loma ili vodljivost mjere se ako se kao analit prati otopljena tvar. Kao detektori koriste se oni s diodnim nizom ("diode-array") (HPLC-DAD sustavi) (omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/VIS području, a apsorbancija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini) i različiti spektroskopski detektori. Među njima najvažniji je spektrometar masa (MS) (identifikacija organskih spojeva) (27, 30, 31).



Slika 9. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC). [pristupljeno: 18.9.2018.] Dostupno na: https://www.google.hr/search?q=teku%C4%87inska+kromatografija+hplc&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjVs9eB8sTdAhWCDSwKHW6aCLoQ_AUICigB&biw=1366&bih=613#imgrc=krfUPwR_aaMqVM:

3.5.3. Vezana tehnika plinska kromatografija-masena spektrometrija , GC-MS (engl. Gas Chromatography–Mass spectrometry)

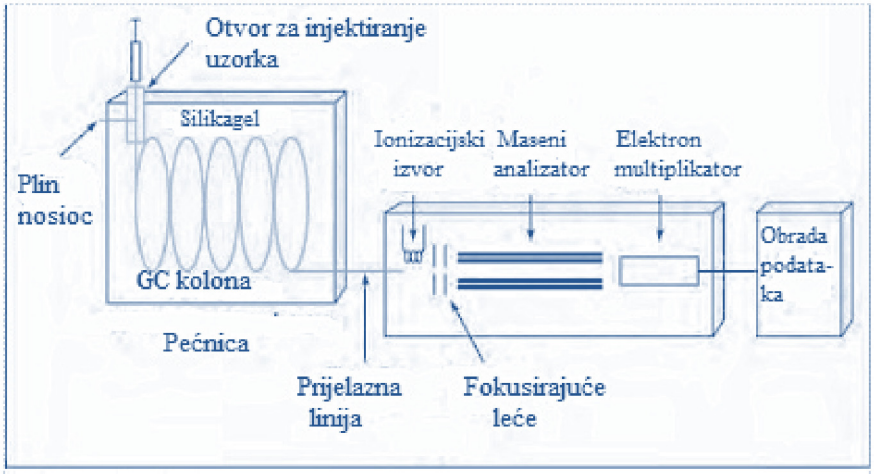
Plinski kromatograf sa spektrometrom masa smatra se zlatnim standardom za identifikaciju spojeva prisutnih u eteričnim uljima. Postupak analize objedinjuje plinsku kromatografiju koja je uspješna metoda za separaciju i kvantifikaciju i spektrometriju masa koja je idealna za kvalitativno određivanje pojedinačnih sastojaka.

Kako uzorak putuje kroz kolonu zbog različitih kemijskih svojstava molekule smjese se razdvajaju. Molekule trebaju različito vrijeme (retencijsko vrijeme, vrijeme zadržavanja) za izlazak iz plinskog kromatografa što masenom spektrometru omogućuje da ionizirane molekule "hvata" i detektira pojedinačno. Detektor na kraju plinskog kromatografa mjeri signal razdvojenih tvari na kraju kolone. Na osi apscisa na dobivenom kromatogramu nalazi

se vrijeme prolaska nekog spoja kroz kolonu, a na osi ordinata signal u obliku vrška koji je proporcionalan koncentraciji određene tvari.

Na osi apscisa na grafičkom prikazu spektrometra masa označava se omjer mase i naboja (*m*/*z*) karakterističan za pojedinu kemijsku skupinu, dok su na ordinati njihovi relativni intenziteti. Omjer *m*/*z* te omjeri visina pika na osi y moraju se poklopiti ako se radi o istom spoju. Primjenom računalnih baza uspoređuju se spektri masa i postotak slaganja te određuje struktura spoja.

Prednosti GC-MS metode su visoka osjetljivost, preciznost, selektivnost i mala količina uzoraka, a nedostatak je visoka temperatura injektora zbog čega se termički labilne tvari prilikom prolaska kroz kolonu razgrađuju. U ovoj metodi koriste se tvari koje se mogu prevesti u plinovito stanje pri temperaturama nižim od 400 ^{o}C, a da se pri tom ne raspadnu (27, 32).



Slika 10. Vezana tehnika plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). [pristupljeno: 18.9.2018.] Dostupno na: https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf%3A309/datastream/PDF/view

4. Rezultati

4.1. Kemijski sastav eteričnih ulja

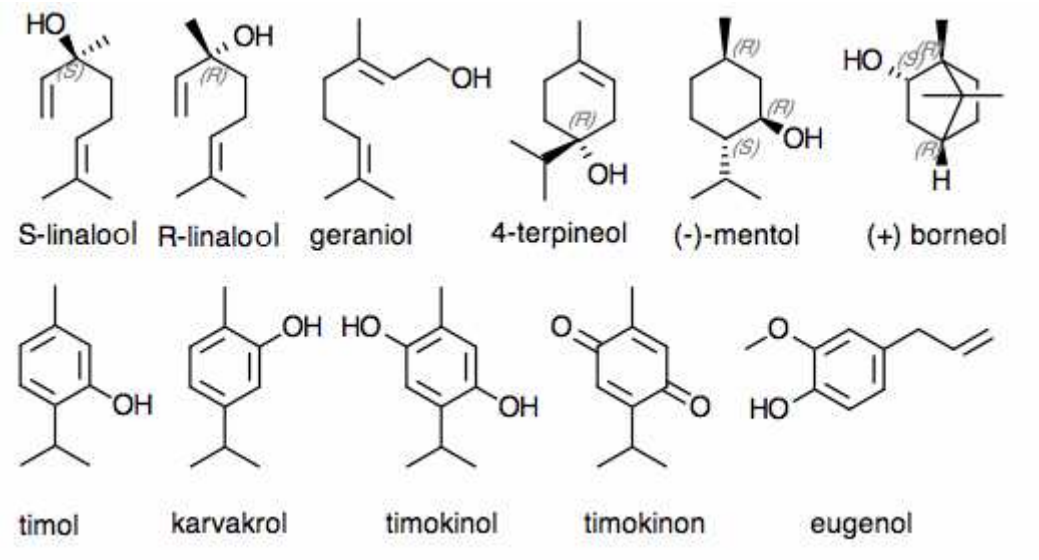
Eterična ulja su složene smjese koje mogu sadržavati veliki broj sastojaka zastupljenih u različitim udjelima. Osnovne građevne jedinice odnosno supstrati za biosintezu eteričnih ulja su acetat, mevalonat i šikiminska kiselina koje prolaze kroz mnogo različitih biotransformacija dajući različite spojeve. Glavne skupine čine terpeni, aromatski i alifatski spojevi. Biosinteza biljnih hlapljivih spojeva uključuje uklanjanje hidrofilnih ostataka, oksidaciju ili hidroksiliranje, redukciju, metiliranje ili reakcije aciliranja. U sintezi sudjeluju biosintetski enzimi koji iz jednog supstrata daju više produkata ili pak djeluju na više supstrata (33). U daljnjem tekstu su navedeni neki od najvažnijih predstavnika izdvojenih kemijskih skupina prisutnih u eteričnim uljima s biološkom aktivnosti.

4.1.1. Terpeni

Terpeni su strukturno i funkcionalno različiti spojevi. Biosintetska osnova svih terpena je izoprenska jedinica, molekulske formule C_5H_8. Molekulska formula poliizoprena je $(C_5H_8)_n$ pri čemu je n broj vezanih izoprenskih jedinica. Ovo pravilo se naziva izoprenskim odnosno C_5-pravilom. Izoprenske jedinice se mogu međusobno povezivati glava na rep u linearne lance ili prstenove. Sam izopren se ne sudjeluje u biosintezi, već njegovi aktivirani oblici, izopentenil-pirofosfat (IPP ili izopentenil-difosfat) i dimetilalil-pirofosfat (DMAPP ili dimetilalil-difosfat). IPP se formira iz acetil-CoA preko mevalonske kiseline u biosintetskom putu HMG-CoA reduktaze. Alternativni put biosinteze koji se odvija u nekim bakterijama i plastidima je MEP (2-metil-D-eritritol-4-fosfat) put. U oba puta, IPP se izomerizira do DMAPP pomoću enzima izopentenil-pirofosfat izomeraze. Sekundarnim modifikacijama, terpeni dobivaju različita svojstva. Monoterpeni (C_{10}) i seskviterpeni (C_{15}) su glavni terpeni u eteričnim uljima. Uz njih također postoje i diterpeni (C_{20}), triterpeni (C_{30}) i tetraterpeni (C_{40}).

4.1.1.1. Monoterpenski alkoholi i fenoli

Povezivanjem dvije izoprenske jedinice nastaju monoterpeni. Monoterpenski alkoholi i fenoli su uz ugljikovodike i etere (okside) najčešće sastavnice eteričnih ulja s biološkom aktivnosti. Neki od najvažnijih prikazani su na slici:



Slika 11. Monoterpenski alkoholi i fenoli prisutni u eteričnim uljima (34).

Alkoholi:

S-linalool nalazi se u eteričnom ulju korijandra (*Coriandrum sativum* L.), a *R*-linalool nalazi se u eteričnom ulju lavande (*Lavandula angustifolia* L.) i bergamota (*Citrus bergamia* Risso). *S*-linalool ima slatkasto-cvjetni miris, dok *R*-linalool pokazuje notu mirisa između mirisa drva i lavande. Geraniol je glavna sastavnica eteričnog ulja palmarose (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats.), a terpinen-4-ol komercijalnog kemotipa čajevca (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel). (-)-Mentol se nalazi u eteričnom ulju paprene metvice (*Mentha piperita* L.). U eteričnom ulju timijana vrste *Thymus satureioides* L. nalazi se borneol (34).

Fenoli:

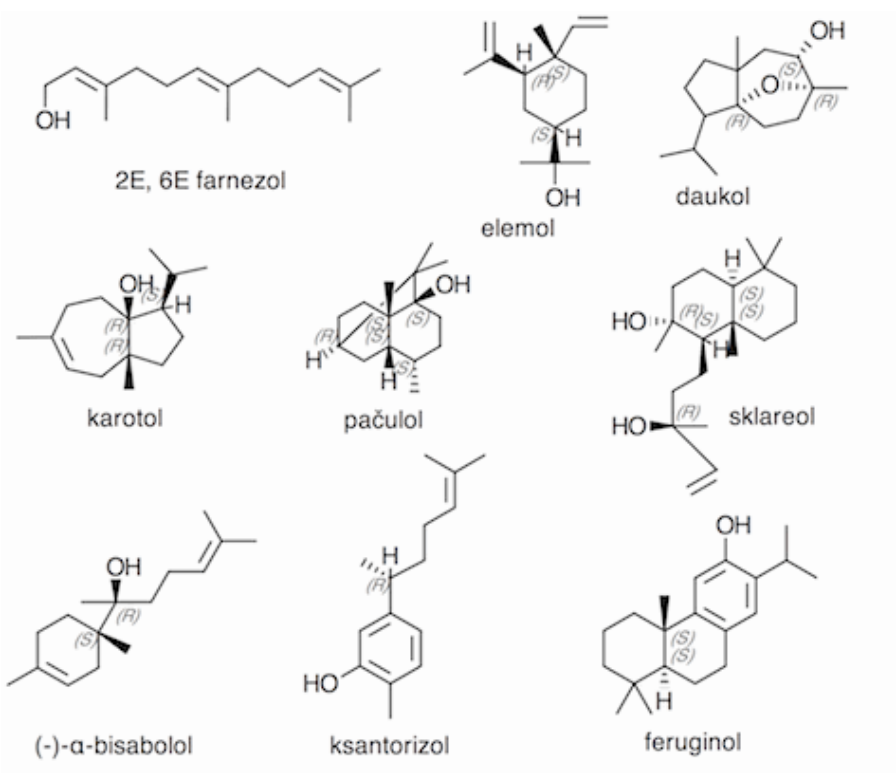
Timol se nalazi u timijanu (*Thymus vulgaris* L.) kemotip timol, karvakrol je prisutan u mravincu (*Origanum vulgare* L.), a timokinon u ulju bergamota (*Monarda fistulosa* L.).

Timokinon je po strukturi kinon, a nalazi se u eteričnom ulju crnog kima (*Nigella sativa* L.*)*. Eugenol je glavni sastojak ulja klinčića (*Syzygium aromaticum* L.) (34).

Molekule mogu biti optički aktivne, a ponekad se dva enantiomera nalaze u različitim biljkama. Na primjer (+)-α-pinen nalazi se biljci *Pinus palustris* Mill., dok je (-)-β-pinen prisutan u *Pinus caribaea* Morelet ili u *Pinus pinaster* Aiton. Korijander (*Coriandrum sativum* L.) sadrži (-)-linalool, dok drvo kamfora (*Cinnamomum camphora* L.) sadrži (+)-linalool. (+)-Citronelol je prisutan u biljci *Eucalyptus citriodora* Hook., a (-)-citronelol u eteričnim uljima ruže (*Rosa* L.) i geranija (*Pelargonum cucullatum* (L.) L'Hér) (1).

4.1.1.2. Seskviterpenski i diterpenski alkoholi i fenoli

Seskviterpeni (C_{15}) nastaju povezivanjem triju izoprenskih jedinica. Diterpenski alkoholi i fenoli imaju 20 ugljikovih atoma. Iako su široko rasprostranjeni, diterpeni u eteričnim uljima, nisu dominantne komponente (manje su isparljivi) (35).

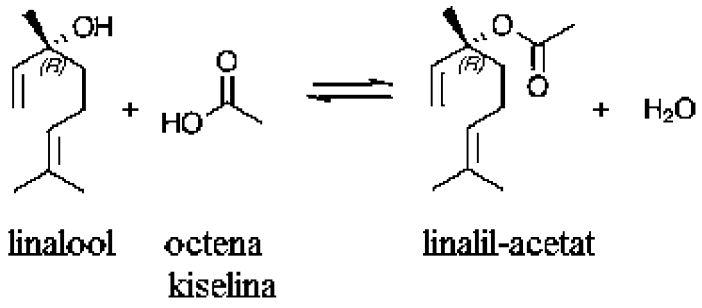


Slika 12. Primjeri seskviterpenskih i diterpenskih alkohola i fenola (35).

Eterično ulje nerolija (gorke naranče) (*Citrus aurantium* L.) sadrži aciklički seskviterpenski alkohol farnezol. Monociklički seskviterpenski alkohol elemol nalazi se u elemiju (*Canarium luzonicum* (Blume) A.Gray). U eteričnom ulju sjemena mrkve (*Daucus carota* L.) nalazi se triciklički duakol i biciklički seskviterpenski alkohol karotol. U muškatnoj kadulji (*Salvia sclarea* L.) nalazi se diterpenski alkohol sklareol. Ksantorizol je seskviterpenski fenol iz kurkume (*Curcuma longa* L.). Diterpenski fenol prisutan u eteričnom ulju borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) je feruginol. U eteričnom ulju njemačke kamilice (*Chamomilla recutita* L.) prisutan je (-)-α-bisabolol (35).

4.1.2. Esteri

Esteri nastaju reakcijom karboksilne kiseline i alkohola. U prirodi nastaju pod utjecajem enzima. Esteri u eteričnim uljima su obično malih molekulskih masa, ugodnog, intenzivnog mirisa tako da eterična ulja bogata njima imaju ugodan, slatkast ili cvjetni miris. Reakcija nastajanja estera je ravnotežna, ester i voda kontinuirano nastaju, ali se istodobno i ester raspada (36).



Slika 13. Reakcija nastajanja estera (36).

Uz alkohole i fenole, esteri su dominantne komponente nekih eteričnih ulja. Često ulja bogata esterima sadrže i alkohol iz kojeg taj ester nastaje. Npr. eterično ulje lavande (*Lavandula angustifolia* L.) sadrži 20-43% linalola (alkohol) i 25-75% estera linalil-acetata.

Učinak estera je spazmolitički i smirujuć što se može povezati s reakcijom nastajanja estera koja je ravnotežna (36).

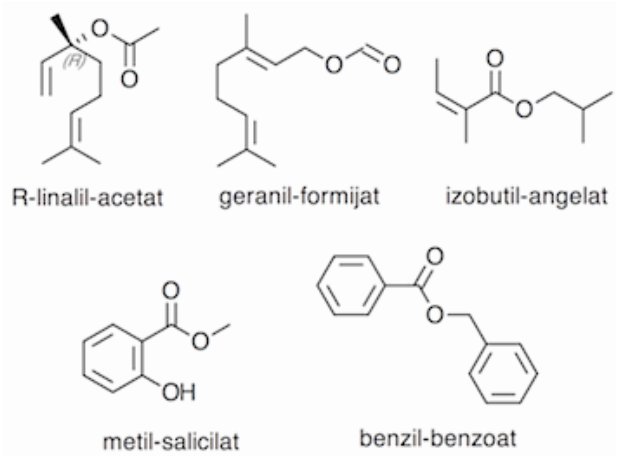
Esteri u eteričnim uljima mogu biti građeni od mono- i seskvi-terpenskih gradivnih spojeva ili od neterpenskih spojeva (nisu sintetizirani u reakcijama sinteze terpena). Kemijski se dijele na:

-estere s C_1-jedinicama (esteri mravlje kiseline, formijati). Npr. spoj geranil-formijat iz eteričnog ulja geranija (*Pelargonum cucullatum* (L.) L'Hér).

-estere s C_2-jedinicama (esteri octene kiseline, acetati). Npr., linalil-acetat u eteričnom ulju lavande (*Lavandula angustifolia* L.), bornil-acetat u ulju crne smreke (*Picea mariana* Mill.) (daje joj karakterističan, slatkast miris), mentil-acetat u eteričnom ulju paprene metvice (*Mentha piperita* L.) (zaslužan za njezin biološki učinak).

-esteri s C_3, C_4 i C_5-jedinicama rjeđe se nalaze u eteričnim uljima. To su esteri propionske (C_3), maslačne, izomaslačne, metakrilne (C_4) kiseline te angelične i izovalerijanske (C_5) kiseline. Izobutil-angelat (neterpenski ester) je aktivna sastavnica rimske kamilice (*Chamaemelum nobile* L.).

-esteri s C_7-jedinicama su pretežito esteri benzojeve kiseline i njenih derivata (aromatski esteri). Npr. metil-salicilat iz eteričnog ulja zimzelena (*Gaultheria procumbens* L.) ili benzil-benzoat iz eteričnog ulja ylang-ylang (*Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson) (36).

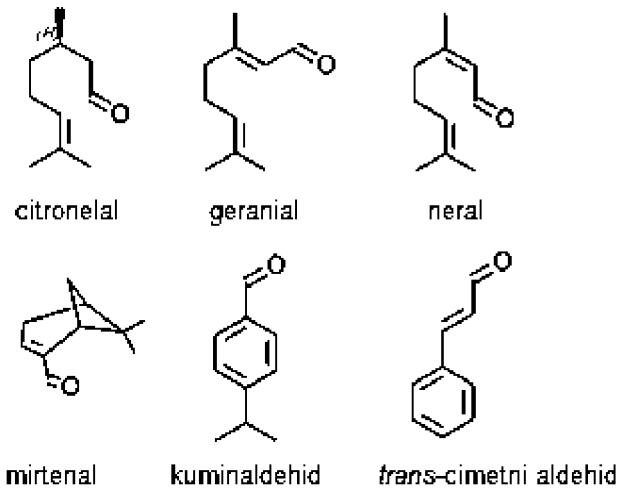


Slika 14. Esteri prisutni u eteričnim uljima (36).

4.1.3. Aldehidi

Aldehidi su važna grupa kemijskih spojeva poznatih po svojoj reaktivnosti. Među najpoznatijima je formaldehid (formalin) koji se koristi za čuvanje uzoraka tkiva i organa u medicini. Vrlo je toksičan kako za bakterije tako i za ljude. Međutim, aldehidi koji se nalaze u eteričnim uljima nisu ni približno toliko toksični (37).

Naziv citral obuhvaća dvije molekule, aldehide geranial i neral. U eteričnom ulju limunske trave (*Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W.Watson) nalazi se 23-35% nerala i 35-47% geraniala. Citronelal je glavni sastojak eteričnog ulja limunskog eukaliptusa (*Eucalyptous citriodora* Hook.). U eteričnom ulju mirte (*Myrtus communis* L.) nalazi se mirtenal, a u eteričnom ulju sjemenki kumina (*Cuminum cyminum* L.) kuminaldehid. *trans*-Cimetni aldehid glavni je sastojak eteričnog ulja kore pravog cimetovca (*Cinnamomum* Schaeff.). Većina aldehida ima snažan, bockav miris. Intenzivne "limunaste arome" imaju citronelal, geranial i neral koji se koriste u parfumeriji pod pojmom aldehidnog mirisa. Miris cimetnog aldehida odgovara mirisu začina cimeta. Aldehidna limunasta eterična ulja kod nekih ljudi djeluju smirujuće, dok kod nekih imaju tzv. "živčani" učinak što zapravo ovisi o osobnim ukusima. Nekima su ta ulja prodornog mirisa pa ih zato ne vole (37).

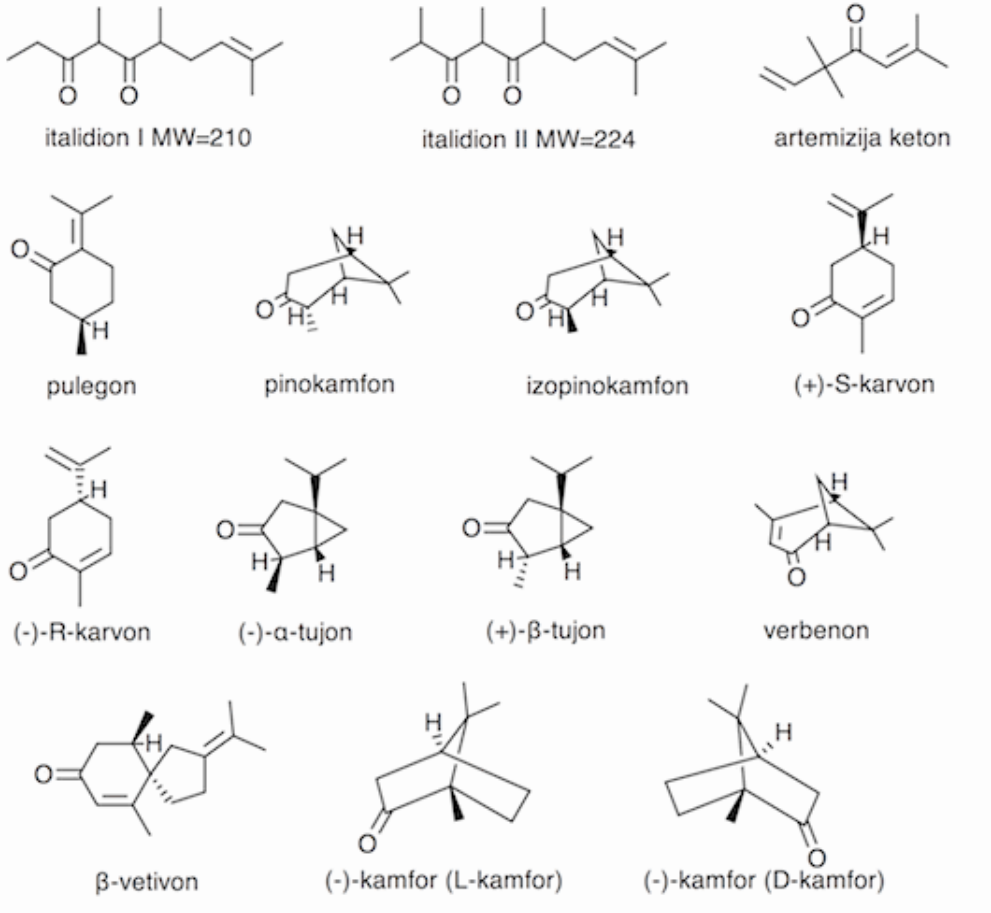


Slika 15. Aldehidi pristuni u eteričnim uljima (37).

4.1.4. Ketoni

Ketoni sadrže karakterističnu *keto* (*karbonilnu*) skupinu u svojoj strukturi. Neka najtoksičnija ulja sadrže ketone, ali neki ketoni su potpuno netoksični kao npr. verbenon (38).

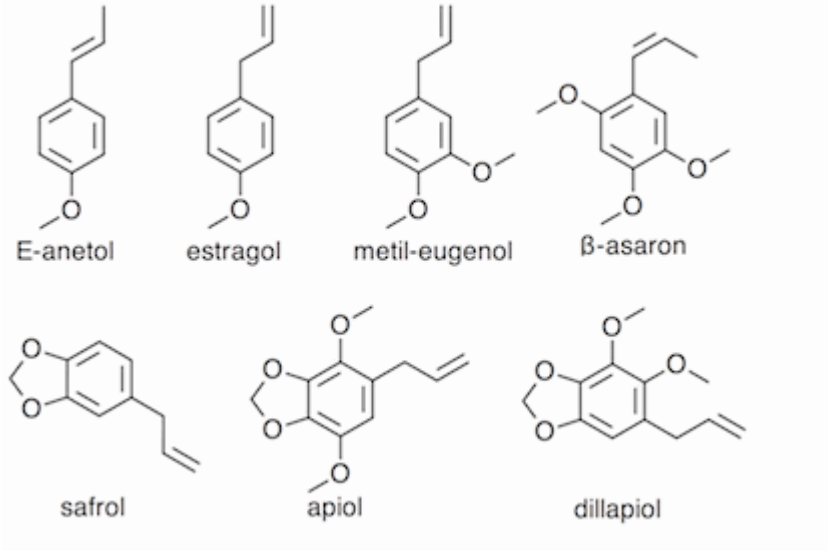
U eteričnom ulju smilja nalaze se italidioni koji spadaju u skupinu β-diketona (sadrže dvije keto skupine). U eteričnom ulju gorkog pelina (*Artemisia absinthium* L.*)* nalazi se artemizija keton s vrlo toksičnim α- i β-tujonom. α-Tujon glavni je spoj eteričnog ulja tuje (*Thuja occidentalis* L.). U eteričnom ulju ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) prisutni su α- i β-tujon. Pulegon je toksičan spoj koji se nalazi u mirisnoj (barskoj) metvici (*Mentha pulegium* L.). Karvon je netoksičan kiralni spoj. (+)-*S*-karvon daje karakterističan miris i djelovanje eteričnom ulju kima (*Carum carvi* L.), a (-)-*R*-karvon sastojak je klasaste metvice (*Mentha spicata* L.), poznatije pod nazivom spearmint i ima potpuno drukčiji miris od kima. U eteričnom ulju miloduha (*Hyssopus officinalis* L.) nalaze se toksični ketoni pinokamfon i izopinokamfon. Verbenon se nalazi u ružmarinu kemotip verbenon (*Salvia rosmarinus* Schleid.) i nekada u lijeku pod nazivom Olozpulmin. U eteričnom ulju vetivera (*Vetiveria zizanioides* L.) nalazi se β-vetivon koji mu daje karakterističnu parfemsku notu. Kamfor je jedan od najpoznatijih spojeva koji se koristi u farmaceutskoj industriji u pripravcima za bolne mišiće i zglobove te za dišni sustav. D-kamfor se pojavljuju u porodici Lauraceae (primjer: kamforovac, *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl), L-kamfor se nalazi u porodici Asteraceae. Na tržištu se nalazi sintetski kamfor koji je racemična smjesa D- i L-kamfora (38).



Slika 16. Ketoni prisutni u eteričnim uljima (38).

4.1.5. Metoksifenoli

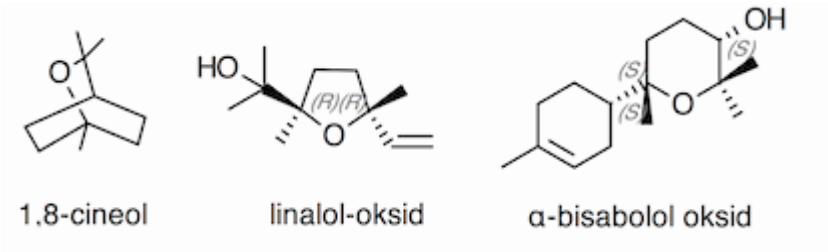
Metoksifenoli su metilni eteri fenola. Vodik u fenolnoj skupini djeluje kao kiselina, daje svojstvo iritativnosti i omogućuje antimikrobno djelovanje. Metoksifenoli su zbog manjka vodika manje iritativni i slabijeg antimikrobnog djelovanja. Najpoznatiji metoksifenoli su estragol (metil-kavikol) i *E*-anetol. Estragol je prisutan u eteričnom ulju bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) i estragona (*Artemisia dracunculus* L.) kemotip metil-kavikol, dok se *E*-anetol nalazi u eteričnim uljima komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) i anisa (*Pimpinella anisum* L.). β-Azaron je komponenta jednog kemotipa iđirota (*Acorus calamus* L.). Safrol je prisutan u sasafrasu (*Sassafras albidum* (Nutt.) Ness) i vrsti *Cinnamomum parthenoxylon* Meisn., a apiol u eteričnom ulju peršina (*Petroselium crispum* (Mill.) Fuss) (39).



Slika 17. Metoksifenoli prisutni u eteričnim uljima (39).

4.1.6. Cikloeteri (oksidi)

Cikloeteri su vrlo česti spojevi u eteričnim uljima. Glavni predstavnik cikloetera je 1,8-cineol koji se nalazi u mnogim eteričnim uljima. Najznačajniji predstavnici prikazani su na slici 18. (40).



Slika 18. Cikloeteri (oksidi) prisutni u eteričnim uljima (40).

1,8-Cineol je monoterpenski cikloeter koji se nalazi u eteričnim uljima mnogih vrsta rodova *Eucalytpus* (eukalitpusa), *Melaleuca* (čajevaca), ulju ravensare (*Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl.) kemotip cineol, u timijanu (*Thymus vulgaris* L.) kemotip cineol. Linalool-oksid je razgradni produkt metabolizma masnih kiselina i u nižim koncetracijama se nalazi u eteričnom ulju ružinog drva (*Rosa* L.) i puzajućeg miloduha (*Hyssopus officinalis* L. var *decumbens*). α-Bisabolool-oksid nalazi se u eteričnom ulju njemačke kamilice (*Chamomilla recutita* L.) (40).

4.2. Biološka aktivnost eteričnih ulja

4.2.1. Citotoksičnost

Eterična ulja zbog svog velikog broja sastavnih komponenti nemaju specifična mjesta djelovanja u stanici. Topljivost komponenti u vodi povezana je s njihovom permeabilnosti kroz staničnu stijenku bakterija ili gljivica. Zbog lipofilnosti eteričnih ulja i topljivosti u fosfolipidnom dvosloju, ona imaju antimikrobno djelovanje. Terpeni ometaju enzimske reakcije metabolizma (41). Ciklički ugljikovodici, npr. aromati, terpeni, cikloalkani primarno djeluju na staničnu membranu. Naime, oni su lipofilni spojevi koji prodiru u staničnu membranu, uzrokuju njezino bubrenje, povećanje fluidnosti i povećanje propusnosti za ione. Rezultat ovih procesa je poremećaj funkcije membrane i proteina integriranih u membranu (41). Karvakrol u odnosu na svoju biološku preteču *p*-cimen sadrži hidrofilnu skupinu u strukturi. Ta hidrofilna skupina omogućuju mu jače antimikrobno djelovanje. Karvakrol destabilizira staničnu membranu, a djelujući kao izmjenjivač protona smanjuje pH gradijent preko citoplazmatske membrane. Nastali kolaps protonske sile pokretanja i iscrpljivanje ATP crpke uzorkuju smrt stanice (42). Eterično ulje čajevca (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) izaziva koagulaciju membrane i autolizu same stanice (43). Neka eterična ulja, a najviše perokosidi (metaboliti spojeva iz ulja) mogu pretjeranim ponovnim unosom i oslobađanjem kalcija (Ca^{2+}) dovesti do smanjenja membranskog potencijala mitohondrija, oštećivanja organela i smrti stanice (44). Pojedina eterična ulja, odnosno njihove komponente

kao što su timol, karvakrol, cimetni aldehid, eugenol i limonen dovode do promjena u strukturi stanične membrane. Ekstrakcijom masnih kiselina i plinskom kromatografijom uočeno je smanjenje koncentracije nezasićenih masnih kiselina u sastavu membrane, a povećanje zasićenih (45). Eterična ulja s cikličkim monoterpenom α-terpinenom djeluju antimikotički. Taj učinak ostvaruju regulacijom gena koji utječu na biosintezu ergosterola i unos sterola. Osim ovog učinka, α-terpinen djeluje indukcijski i na gene povezane s metabolizmom lipida, strukturom i funkcijom stanične stijenke, detoksifikacijom i staničnim transportom (46). Zbog načina djelovanja eteričnih ulja, odnosno komponenti ulja, na više staničnih dijelova istodobno, rezistencija se rijetko javlja. Primjer rezistencije je bakterija *Bacillus cereus* koja smanjuje osjetljivost na karvakrol smanjenjem fluidnosti membrane i izmjenom njenog sastava (47). Isto tako, *Pseudomonas aeruginosa* povećava toleranciju na eterično ulje čajevca promjenama u funkciji bakterije, energiji vanjske membrane i sustavu za izbacivanje (48).

4.2.2. Fototoksičnost

Fototoksičnost je kožna reakcija koja nastaje kada se tvar aktivira uslijed izlaganja suncu. Neka eterična ulja sadrže fotoaktivne molekule. Primjerice eterično ulje bergamota (*Citrus aurantium* ssp. *bergamia*) sadrži begapten (5-metoksipsolaren) koji spada u skupinu furokumarina. Psolaren, ali i druge fototoksične molekule apsorbiraju energiju ultraljubičastog zračenja (svjetla) čime dovode do stvaranja aktivnih derivata koji mogu izazvati oštećenje stanice. Fototoksičnost treba razlikovati od citotoksičnosti. Citotoksičnost eteričnih ulja dovodi do oštećenja staničnih membrana i prooksidativnim djelovanje uzrokuje stvaranje slobodnih kisikovih radikala (ROS). Izloženost svjetlu ne utječe značajno na odvijanje ovih reakcija. S druge strane, eterična ulja sa svojstvom fototoksičnosti prodiru u stanicu bez oštećenja stanične membrane, proteina ili DNK te uslijed izloženosti svjetlu i apsorpciji sunčeve energije pobuđuju određene molekule koje tada mogu dovesti do oštećenja makromolekula i stvaranja adicijskog spoja DNK, proteina i membrane. Hoće li eterično ulje djelovati cito- ili foto-toksično ovisi o vrsti molekula koje ono posjeduje. Primjerice, eterično ulje drveta *Fusanus spicatus* je citotoksično, ali nije fototoksično, dok eterična ulja *Citrus aurantium dulcis* L. (*Citrusgracilis subf. Dulcis*) i *Cymbopogon citratus* (DS.) Stapf imaju svojstva citotoksičnosti i fototoksičnosti (49,50).

4.2.3. Mutagenost

Mutagenost je sposobnost kemijskog, biološkog ili fizičkog agensa da mijenja genetski materijal (strukturu ili organizaciju). Mutageni agensi najčešće djeluju na razini DNK, izazivaju mutacije koje mogu dovesti do karcinoma, tako da su neki mutageni ujedno i kancerogeni.

4.2.3.1. Nuklearna mutagenost

Menton iz eteričnog ulja mente (*Mentha spicata* L.) pokazuje snažno genotoksično djelovanje u ispitivanju provedenom na *Drosophlia melanogaster* (51). Alklilbenzeni, α- i β-azaron pokazuju svojstvo genotoksičnosti u hepatocitima glodavca. Alkilbenzeni izazivaju neplaniranu sintezu DNK u hepatocitima. Glavni metabolit azarona je 2,4,5-trimetoksicimetna kiselina koja je određena tekućinskom kromatografijom i masenom spektroskopijom. Odvojenim testom metabolit nije pokazao genotoksičnost. Jednostavni alilbenzeni safrol, estragol i metileugenol procesima 1-hidroksilacije i sulfatacijom postaju genotoksični. Propilni analozi izosafrol, anetol ne mogu proći 1-hidroksilaciju i nisu genotoksični (52).

Cimetni aldehid, karvakrol, timol i (+)-*S*-karvon inhibirali su održivost i proliferaciju Hep-2 stanica ovisno o dozi. IC_{50} se kretao u testu održivosti (primjenjuje se za ispitivanje sposobnosti organa, tkiva i stanica da se održe ili oporave u nefiziološkm uvjetima) od 0,3 Mm (za cimetni aldehid) do 0,7 mM (za timol). U proliferacijskom testu IC_{50} varira između 0,2 Mm (za karvakrol) i 0,9 Mm (za karvon). U Ames testu (metoda za ispitivanje mutacija primjenom određene kemikalije na bakteriju) karvakrol i timol su uzrokovali povećanje mutacija 1,5-1,7 puta. U SOS-chromotest-u (kolorimetrijska metoda koja mjeri genotoksičan potencijal kemikalija primijenjenih na *Escherichia coli*) ni jedan sastojak nije pokazao genotoksičnost pri netoksičnim dozama. U ispitivanju popravka oštećene DNK genotoksičnost ovisnu o dozi pokazao je karvon, manje cimetni aldehid, a najmanje timol i karvakrol (53).

Genotoksičnost eugenola (1-alil-3-metoksi-4-hidroskibenzen) proučavana je ispitivanjem na V79 stanicama s kromosomskim aberacijama (strukturne promjene na kromosomima nastale zbog loma kromosoma ili greške prilikom "crossingovera") (CAs), s ili

bez biotransformacije jetre štakora (S9). Eugenol je inducirao kromosomske aberacije pri većim dozama (2500 μM). Biotransformacije u jetri također su inducirale aberacije ovisno o dozi. Porast endoredupliciranih stanica (stanice s većim sadržajem gena zbog izostanka mitoze, poliploidija) je značajan. Kako je endoreduplikacija povezana s inhibicijom topoizomeraze II., kao kontrolni induktor endoreduplikacije korišten je ICRF-193. Eugenol i ICRF-193 djeluju kao inhibitori topoizomeraze II. i genotoksično (54).

4.2.3.2. Citoplazmatska mutagenost

Ispitivanja svojstva citotoksičnosti, mutagenosti ili anti-mutagenosti eteričnih ulja najčešće se provode na bakterijama (*Salmonella typhimurium* – Ames test, *Escherichia coli* – SOS-chromotest, *Bacillus subtilis*-test popravka DNK), stanicama sisavaca (humani limfociti, hepatociti, MLA (engl. mouse lymphoma assay, test za otkrivanje mutagenih događaja na timidin-kinazi mišjeg limfoma) ili na insektima (*Drosophila melanogaster* – SMART test). Primjenom ovih testova nije moguće odrediti mehanizam i ciljna mjesta djelovanja eteričnih ulja. Također, ne može se odrediti je li poremećaj u metabolizmu energije odnosno disanju uzrok citotoksičnosti, mutagenosti ili anti-mutagenosti. Iz tog razloga ispitivanja na kvascu (*Saccharomyces cerevisiae*) su se pokazala učinkovita. Testovi na kvascima pokazali su povezanost poremećaja u respiracijskom sustavu sa staničnom smrti, ali i mitohondrije kao ciljano mjesto djelovanja mnogih eteričnih ulja (1).

Mnoga eterična ulja kao npr. eterično ulje luka, češnjaka, cimeta, timijana ili mravinca odgađaju, odnosno smanjuju proizvodnju etanola u stanicama kvasca. Pri visokim koncentracijama učinak jedino pokazuju ulja cimeta, klinčića, češnjaka i timijana. Većina eteričnih ulja otežava respiratornu aktivnost kvasca što dovodi do smanjene proizvodnje ugljičnog dioksida, a najviše oleorezin iz eteričnog ulja timijana. Eterična ulja također smanjuju sporulaciju kvasca (55).

α-Pinen je čest sastojak mnogih eteričnih ulja te utječe na energetski metabolizam mitohondrija izoliranih iz kukuruza (*Zea mays* L.). Učinak α-pinena na potrošnju kisika ne razlikuje se s obzirom na izvor mitohondrija ili supstrata. Djeluje i tako da smanjuje transmembranski potencijal. Najmanje su dva načina djelovanja α-pinena: odvajanjem oksidativne fosforilacije i inhibicijom prijenosa elektrona. α-Pinen snažno inhibira proizvodnju mitohondrijskog ATP (56).

4.2.4. Kancerogenost

Većina eteričnih ulja ima svojstvo citotoksičnosti, no bez svojstva mutagenosti i kancerogenosti. Aktivacijom pojedinih metabolita eteričnih ulja mogu nastati potencijalni kancerogeni spojevi (57). Potencijalno svojstvo genoksičnosti eteričnog ulja bergamota (*Citrus aurantium* ssp. *bergamia*) i njegovog glavnog sastojka bergaptena (5-metoksipsoralen (5-MOP)) pruočavano je ispitivanjem na kvascu (*Saccharomcyes cerevisiae*) koji je bio izložen sunčevom zračenju. Izazvana fotoreakcija uzrokuje mutacije. Genetičke promjene izazvane eteričnim uljem bergamota i bergaptena ne ovise o prisutnosti kisika. Primjenom kemijskih filtera (UVA i UVB filteri) smanjuje se prodiranje eteričnog ulja s 5-metoksipsoralenom kroz kožu, smanjuje se biološka aktivnost eteričnog ulja odnosno postiže se zaštita od neželjenih genotoksičnih učinaka (58).

Ispitivanjem na kvascu (*Saccharomyces cerevisae*) kao relevantnom eukariotskom modelu dokazana je i fotogenotoksičnost 8-metoksipsoralena (8-MOP) u prisutnosti UV zračenja. 8-MOP i UV inducirali su gen za ribonukleotidnu reduktazu RNR2 i doveli do stvaranja DNK dvostrukih lanaca koji predstavljaju intermedijere popravka DNK. Također, aktivnost gena za popravak oštećenja RAD51 bila je povećana čime je dodatno potvrđeno kako 8-MOP i UV u kombinaciji dovode do fotogenotoksičnosti u eukariotskim stanicama (59).

Aristolološka kiselina prisutna u biljkama *Aristolochia* spp.*,* sadrži nitro skupinu koja se reducira djelovanjem hepatičnog citokroma P450 (CYP1A1/2) ili peroksidazama prisutim u ekstrahepatičnim tkivima. Tom redukcijom stvara se ciklički nitronijev ion. On reagira s DNK i proteinima, aktivira H-ras onkogen, izaziva mutacije i kancerogeneze. Pulegon koji se nalazi u eteričnom ulju mnogih vrsta metvice i teukrin A, diterpeonid iz biljke *Teuchrium chamaedrys*, primjeri su potencijalnih kancerogena. Metabolizmom pulegon prelazi u *p*-krezol koji iscrpljuje glutation. Teurkin A oksidacijom putem CYP3A4 prelazi u reaktivni epoksid koji reagira s proteinima poput citokroma P450 ili hidrolaza.

Pojedini sastojci hrane ili biljaka mogu metabolizmom u organizmu stvoriti reaktivne međuprodukte koji će ireverzibilno inhibirati različite CYP enzime. Neki modificiraju hem CYP-a, neki apoproteine, a neki oboje. Tako primjerice djeluje bergamotin, furanokumarin koji je sastojak soka od grejpa, kapsaicin iz chili paprike, izoflavan iz korijena sladića, resveratrol koji je sastavnica crnog vina. Citokrom P450 metabolizira većinu lijekova i

aktivira mnoge prokancerogene te je važno poznavati moguće interakcije lijekova s biljnim lijekovima (proizvodima) i moguću važnu kemoprotektivnu ulogu biljaka (60).

Derivati alkenilbenzena, njih 23, bilo prirodnih ili sintetičkih ispitivani su kao potencijalni kancerogeni zbog strukturne povezanosti s hepatokarcinogenim safrolom (1-alil-3,4-metilendioksibenzen). Neki od tih spojeva kao npr. safrol, estragol, eugenol, metileugenol, miristicin prisutni su u začinima (npr. kopar, peršin), eteričnim uljima i u povrću. Estragol (1-alil-4-metoksibenzen) i njegov metabolit 1'-hidroksiestragol pokazali su kancerogeni učinak u pokusu na miševima. Inducirali su pojavu karcinoma jetre. Eugenol (1-alil-4-hidroksi-3-metoksibenzen) i anetol (*trans*-4-metoksi-1-propenilbenzen) nisu pokazali kancerogenu aktivnost. Za razliku od njih, metileugenol (1-alil-3,4-dimetoksibenzen) i njegov 1'-hidroksi metabolit pokazuju kancerogenu aktivnost poput estragola i njegovog aktivnog metabolita. 1-Alil-l-hidroksi-4-metoksinaftalen pokazuje manju aktivnost. Elemicin (1-alil-3,4,5-trimetoksibenzen) i njegov 1'-hidroksi metabolit nisu pokazali kancerogenu aktivnosti kao ni apiol iz kopra (1-alil-2,3-dimetoksi-4,5-metilendioksibenzen) i peršina (1-alil-2,5-dimetoksi-3,4-metilendioksibenzen). Esteri derivata estragola mnogo su aktivniji od samih metabolita, dok oksidi ne pokazuju kancerogeno djelovanje. Primjena estragola, njegovog 1'-hidroksi metabolita, eugenola, 2',3'-oksida safrola i 1'-hidroksisafrola u obliku kantarionovog ulja na koži mišica inducirao je benigni tumor kože (61).

4.2.5. Antimutagena svojstva eteričnih ulja

"Dezmutageni" i "bio-antimutageni" sprječavaju induciranu staničnu mutagenezu. "Dezmutageni" inaktiviraju mutagene prije njihovog vezanja za DNK i posljedičnog oštećenja. To su različiti enzimi, kemijska sredstva ili prirodni stanični metaboliti koji se vežu na mutagene ili s njima reagiraju. "Dezmutageni" koriste različite mehanizme djelovanja, tako npr. onemogućuju aktivaciju promutagena u mutagene, stimuliraju enzime (glutation-S-transferaza) koji kataliziraju ili inaktiviraju štetne elektrofilne molekule, izravno se vežu na mutagene ili promutagene i inaktiviraju ih ili onemogućuju njihov ulazak u stanicu. "Bio-antimutageni" interferiraju s procesima vezanja za stanicu i oštećenja DNK (62).

Antimutageni učinak protiv benzo[a]pirena (B[a]P) i ciklofosfamida (CP) potvrđen je Ames testom (metoda za ispitivanje mutacija primjenom određene kemikalije na bakteriju) za

često korišten začin *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl. Dodatno su korišteni i mikronukleotički testovi (pregled potencijalno genotoksičnih spojeva) *in vivo.* Kako bi se utvrdio mehanizam djelovanja *C. cassia* proučavani su enzimi: citokrom P450, glutation (GSH), glutation-S-transferaza (GSH), glutation-reduktaza (GR) i glutation-peroksidaza (GPX). *C.cassia* smanjuje sadržaj citokroma P450, a povećava sadržaj glutationa i o njemu ovisnih antioksidacijskih enzima čime ostvaruje antimutagensko djelovanje (63.)

Apigenin i taninska kiselina pokazali su inhibitorni učinak na genotoksično djelovanje 1-nitropirena (1-NP) i 1,6-dinitropirena u ispitivanju na sojevima *Salmonella* i stanicama jajnika kineskog hrčka (CHO). Svoje antimutagensko djelovanje apigenin i taninska kiselina ostvaruju inaktivacijom metabolizama nitropirena, odnosno inhibicijom djelovanja nitroreduktaze (64).

Eterično ulje kamilice (*Matricaria chamomilla* L.) pokazalo je također potencijalni antimutageni učinak. Ispitivanja su rađena na stanicama mišje koštane srži koje su prethodno bile tretirane daunorubicinom i metilmetansulfonatom (MMS). Eterično ulje kamilice inhibiralo je izmjenu sestrinskih kromatida potenciranu primjenom daunorubicina i MMS-a. Učinak inhibicije ovisi o dozi (65).

Glavni sastojak eteričnog ulja kamilice je seskviterpenski alkohol α-bisabolol (BISA). Njegovo svojstvo antimutagenosti ispitivano je primjenom najvećih netoksičnih doza na natrijev azid (SA), 4-nitrokinolin-N-oksid (4-NQNO), nitro-o-fenilendiamin (NPD), ciklofosfamid (CP), benzo[a]piren (B[a]P), aflatoksin B1 (AFB1), aminoantracen (2-AA) i 2-aminofluoren (2-AF). α-Bisabolol nije utjecao na mutageno djelovanje SA i NPS, a na 2-NF vrlo slabo. Značajan učinak ostvaren je na mutageno djelovanje AFB1, B[a]P, CP, 2-AA, 2-AF. Učinak ovisi o dozi BISA. BISA inhibira i pentoksirezorufin-o-dependentilazu i etoksiresorufin-o-deetilazu koji su markeri za citokrome CYP2B1 i 1A1 mikrosoma jetre štakora. CYP2B1 pretvara AFB1 i CP u mutagene metabolite, a CYP1A1 aktivira B[a]P, 2-AA i 2-AF BISA te antimutageno djelovanje ostvaruje inhibicijom aktivacije proonkogena (66).

Eterično ulje lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.) pokazalo je značajno antimutageno djelovanje na stanice *Salmonella typhimurium* TA98 prethodno tretirane s 2-nitrofluorenom te umjereno na one tretirane s 1-nitrofluorenom. Učinak također ovisi o dozi primijenjenog ulja (67). Eterično ulje kadulje (*Salvia officinalis* L.) i njegovi osnovni sastojci, monoterpeni tujon, 1,8-cineol i limonen smanjili su broj UV-induciranih mutacija u kulturi *Salmonella* i *Escerichia coli*. (68).

Antimutagena aktivnost eteričnog ulja *Origanum compactum* Benth. ispitivana je pomoću SMART (testa za otkrivanje somatskih mutacija (promjene genetskog materijala u tjelesnim stanicama) i rekombinacija) na *Drosophila melanogaster*. Eterično ulje je pokazalo jak inhibicijski učinak protiv mutagenosti izazvane s uretanom, dok je učinak slabiji na mutagenost izazvanu metil-metansulofonatom (MMS). Antimutageno djelovanje eterično ulje *Origanum compactum* Benth. ostvaruje inhibicijom metaboličke aktivacije, a glavni sastojak s tim djelovanjem je karvakrol (69).

Antigenotoksični učinci eteričnih ulja iz biljaka *Origanum compactum* Benth., *Artemisia herba-alba* Asso., *Cinnamomum camphora* (L.) J.Prisl. poučavani su na eukariotskim stanicama kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*. Kao mutageni u ispitivanju su korišteni UVA zračenje, metoksipsoralen uz primjenu UVB zračenja i metil-metansulfonata (MMS). U prisutnosti eteričnih ulja ti mutageni manje dovode do oštećenja mitohondrija. Manja je učestalost nuklearnih genetskih promjena izazvanih primjenom UVB ili metoksipsoralena i UVB. Istodobnom primjenom eteričnih ulja uz MMS potaknuta je kasna apoptoza tj. nekroza čime se povećao broj ubijenih stanica i smanjio broj mutacija. U ovim slučajevima antimutageno djelovanje eteričnih ulja temelji se na indukciji mitohondrijske disfunkcije (70).

Mitohondriji su važni za nekoliko osnovnih staničnih aktivnosti kao što su stvaranje adenozin-trifosfata (ATP), biosinteza hema, steroida, pirimidina, homeostaza kalcija i željeza te apoptoza (programirana stanična smrt). Stvaranjem superoksida i vodikovog peroksida nastaju reaktivni međuprodukti koji mogu oštetiti makromolekule. Jedan od ciljeva oštećenja je mitohondrijska DNA (mtDNA) koja uslijed oštećenja proizvodi manje proteina važnih za regulaciju reaktivnih kisikovih oblika (ROS). U konačnici, proces apoptoze više nije reguliran i može doći do razvoja mnogih bolesti uključujući i karcinome, kardiovaskularne bolesti i brojne druge (71).

4.2.6. Antioksidacijsko djelovanje

Antioksidansi su molekule koje imaju sposobnost inhibirati oksidaciju drugih molekula. Reakcijom oksidacije i prijenosom elektrona ili vodika na oksidativni agens nastaju slobodni radikali koji pokreću lančanu reakciju koja oštećuje ili uništava stanicu (72).

Voće, povrće, začini ili bilje sadrže antioksidanse. Neki od poznatijih su karotenoidi, retinoidi, askorbinska kiselina, tokoferoli, flavonoidi, polifenoli i fenolne kiseline. Eterična ulja također sadrže antioksidanse kao što su terpenoidi i fenolni spojevi (1).

Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja origana i kadulje, vrsta *Origanum onites* L. i *Origanum indercedens* L. te *Salvia officinalis* L. i *Salvia fructicosa* Mill. ispitana je rancimat testom (test za ispitivanje oksidacijske stabilnosti eteričnih ulja) i "crocin" testom (test za određivanje antioksidacijskog potencijala primjenom karotenoida (engl.crocins)). Fenolni spojevi određeni su HPLC-om. Ukupni sadržaj fenolnih spojeva jednak je u obje vrste, dok je ružmarinska kiselina više zastupljena u *Origanum indercedens* L. Udio karvakrola se razlikuje između listova i cvjetova. Eterično ulje *Origanum indercedens* L. pokazalo je "crocin" testom veću antioksidacijsku aktivnost, dok razlike između vrsta nije bilo u rancimat testu. Eterično ulje kadulje vrste *Salvia frutosa* Mill. sadrži više karnozične kiseline i metil-karnozata te pokazuje veću antioksidacijsku aktivnost od vrste *Salvia officinalis* L. Uzorci kadulje pokazali su veću antioksidacijsku aktivnost od uzoraka origana (73).

Eterično ulje iz lišća sirijskog origana (*Origanum syriacum* L.) sadrži monoterpene, oksigenirane monoterpene i seskviterpene određene GC-MS-om. γ-Terpinen, karvakrol, *p*-cimen i β-kariofilen glavne su sastavnice eteričnog ulja. Redukcijska snaga eteričnog ulja ispitivana je usporedbom s askorbinskom kiselinom, a antioksidacijska aktivnost i sposobnost uklanjanja radikala uspoređivane su s 2,6-di-terc-butil-4-metilfenolom (BHT). Antioksidacijska aktivnost eteričnog ulja bila je nešto niža u odnosu na aktivnost askorbinske kiseline ili BHT-a što ulje čini učinkovitim prirodnim antioksidansom (74).

Eterično ulje *Melissa officinalis* L. ima veliki kapacitet za uklanjanja slobodnih radikala (RSC) i jak učinak na lipidnu peroksidaciju (LP). RSC se procjenjuje primjenom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) i hidroksil (OH•) radikala. Jak učinak inhibicije na LP procjenjuje se primjenom Fe^{2+}/askorbat i Fe^{2+}/H_2O_2 indukcijskih sustava. Najsnažniji kapacitet za uklanjanje slobodnih radikala pokazali su monoterpenski aldehidi i ketoni (neral/geranial, izomenton i menton) te mono- i seskvi-terpenski ugljikovodici (kariofilen) (75).

Eterična ulja *Thymus vulgaris* L., *Ocimum basilicum* L. i *Origanum vulgare* L. pokazala su značajnu antioksidacijsku aktivnost u ispitivanju sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala (2,2-difenil-l-pikirilhidrazil (DPPH•) i hidroksil (OH•) radikali). *Thymus vulgaris* L. najjače djeluje na OH• radikale. Također, ova ulja pokazuju i snažan inhibicijski

učinak na lipidnu peroksidaciju (LP) primjenom Fe^{2+}/askorbat i Fe^{2+}/ H_2O_2 indukcijskih sustava (76).

Timol, karvarol, 6-đinđerol i hidroksitirozol inhibiraju lipidnu peroksidaciju u Fe^{3+}/askorbat indukcijskom sustavu, dok je zingerol imao slab inhibicijskih učinak. Hidroksitirozol dovodi do oštećenja DNA u sustavu bleomicin-Fe^{3+} za razliku od timola, kravakrola i 6-đinđerola koji bi zbog svojih dobrih antioksidacijskih svojstava mogli biti zamjena sintetičkim antioksidansima koji se koriste u konzerviranju hrane (77).

Antioksidacijsko djelovanje polifenolnih spojeva važno je u sprječavanju neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova ili Parkinsonova bolest. Oksidativni stres koji je uključen u patofiziologiju mnogih bolesti i dovodi do oštećenja neurona, njihove apoptoze ili nekroze može se spriječiti primjenom fenolnih spojeva (78).

4.2.7. Antimikrobna i antifungalna aktivnost

Eterično ulje iz lišća sirijskog origana (*Origanum syriacum* L.) pokazalo je antimikrobnu djelovanje na 13 od 16 vrsta mikroorganizama metodom difuzije (agar-disk) (79).

Antimikrobna i antifungalna aktivnost eteričnih ulja *Thymus vulgaris* L., *Ocimim basilicum* L. i *Origanum vulgare* L. testirana je na 13 bakterijskih sojeva i 6 gljivica. Najučinkovitijim se pokazalo eterično ulje origana. Djelovalo je čak na multirezistentne sojeve poput *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli.* Prethodno navedena eterična ulja imaju i značajnu antifungalnu aktivnost (76).

Eterično ulje matičnjaka, *Melissa officinalis* L., također pokazuje antimikrobnu i antifungalnu aktivnost. Vrlo učinkovito antibakterijsko djelovanje pokazalo se na multirezistentnom soju *Shigella sonei*, a antifungalno na *Trichophyton* vrstama (75).

Antimikrobno djelovanje protiv Gram-pozivnih i Gram-negativnih bakterija pokazuju i eugenol i cimetni aldehid koji su komponentne raznih eteričnih ulja. Eugenol djeluje baktericidno na *Listeria monocytogenes* i *Lactobacillus sakei*, dok cimetni aldehid djeluje baktericidno samo na *Listeria monocytogenes*. Mehanizam djelovanja ovih komponenti eteričnih ulja nije jasan, no pretpostavlja se da inhibiraju proizvodnju energije u bakterijama i djeluju na permeabilnost membrane (80).

Baktericidan učinak na *Escherichia coli* pokazuju eugenol, cimetni aldehid i karvakrol (81). Na *Escherichia coli* inhibicijski djeluje i timol i (+)-karvon, iako je djelovanje (+)-karvona slabije u odnosu na prethodno navedena ulja. *trans*-Cimetni aldehid pokazuje značajan toksičan učinak na *Photobacterium leiognath*. Timol i karvakrol oštećuju staničnu membranu bakterija te smanjuju intracelularni ATP u bakteriji *E. coli* (81).

Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja mravinca i cimeta te njihova kombinacija ispitana je na 48 kliničkih izolata i 12 referentnih sojeva. Svi sojevi su pokazali osjetljivost na oba eterična ulja i njihovu kombinaciju bez obzira na moguću rezistenciju na antibiotik. Eterična ulje cimeta i mravinca ne pokazuju sinergistični niti antagonistički učinak. Nakon višestruke izloženosti eteričnim uljima otpornost *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* i *Proteus mirabilis* se povećala (82).

Eterična ulja marokanskih vrsta timijana *Thymus maroccanus* i *Thymus broussonetti* pokazala su značajnu antimikrobnu aktivnost protiv mnogih bakterija kao što su npr. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*. Ova eterična ulja pokazuju i značajan sinergistički učinak s mnogim antibioticima, posebice sinergizam karvakrola (glavna komponenta eteričnih ulja) i ciprofloksacina. Utjecaj ovih eteričnih ulja na Gram-pozitivne bakterije je jači nego na Gram-negativne. Svoj učinak ulja ostvaruju djelovanjem na efflux pumpu (služi za izbacivanje neželjenih tvari iz bakterija (npr. lijekovi)) i strukturu lipopolisaharida (83, 84).

trans-Cimetna kiselina pokazala je značajnu inhibiciju na *Mycobacterium tuberculosis.* Njezinom primjenom povećala se aktivnost antibiotika izonijazida, ofloksacina, rifampina, amikacina i klofazimina (85).

4.2.8. Antivirusno djelovanje

1,8-Cineol djeluje antivirusno pogotovo na virusne infekcije dišnog sustava, kože i sluznice. 1,8-Cineol djeluje na zreli virus, a ne na stadij razmnožavanja virusa u stanici. Eterična ulja bogata 1,8-cineolom zbog djelovanja na kašalj, upalu i protiv virusa vrlo su popularna u liječenju dišnih infekcija (40).

Iako se za liječenje virusnih infekcija u aromaterapiji najviše primjenjuju eterična ulja bogata alkoholima i cikloeterima (oksidima), aldehidna ulja također pokazuju antivirusni

učinak. Eterično ulje matičnjaka koje sadrži aldehide neral, geranial i citronelal djeluje inhibitorno na virus herpesa. Protiv herpesa učinkovitost je pokazalo i eterično ulje limunske trave. Prilikom primjene aldehidnih eteričnih ulja treba biti oprezan zbog njihovog iritativnog djelovanja, stoga je najbolja primjena u smjesama u kojima imaju niži postotak (37).

4.2.9. Spazmolitičko djelovanje

Biljke pout lavande i rimske kamilice koje sadrže eterična ulja bogata esterima koriste se od davnina kao spazmolitičke biljke. Spazmolitički djeluju na poprečno-prugaste i glatke mišiće zbog čega se primjenjuju kod tegoba u probavnom sustavu ili lokalno, u masažama, kod opušanja mišića lokomotornog sustava. Linalil-acetat spazmolitičko djelovanje ostvaruje kontroliranjem defosfoforilacije lakih lanaca (povećava aktivnost enzima MLC-fosfataze) i povećanje aktivnosti NO-sintaze koja sintetizira dušikov-oksid i doprinosi opuštanju mišića (86). Također, linalil-acetat iz eteričnog ulja bergamota (*Citrus bergamia* Risso) smanjuje dotok kalcija u mišiće i sprječava kontrakciju (87).

Sinergistički učinak alkohola i estera vrlo je važan za spazmolitičko djelovanje. Kod različitih oblika perifernih neuropatija primjena linaloola i eteričnog ulja iz bergamota (*Citrus bergamia* Risso) smanjila je hipersenzitivnost (blokada prijenosa signala blokadom MAP kinaze) (88).

Eterična ulja bogata *E*-anetolom i estragolom koriste se u aromaterapiji kao spazmolitici u probavnom sustavu (89). Metoksifenoli estragol i *E*-anetol djelovanjem na TRPV1 receptor izazivaju hipotenziju (snižen krvni tlak) i bradikardiju (smanjena srčana frekvencija) te se kao ulja vrlo rado koriste u aromamasažama kao spazmolitici i za opuštanje (90).

Osim već navedene lokalne primjene, putem koje se eterično ulje dobro apsorbira u kožu, neka ulja se mogu koristiti i oralnim putem. Primjerice eterično ulje paprene metvice (*Mentha piperita* L.) (36,39).

4.2.10. Anksiolitičko djelovanje

Učinak eteričnih ulja kroz inhalacije ili masaže nije dovoljan da "zamijeni" lijekove kada se radi o težim oblicima anksioznosti (tjeskobe), no to ne čini njihovu primjenu potpuno nepotrebnom. Naime, eterična ulja mogu biti odlična dodatna terapija. U blažim oblicima ona mogu biti vrlo efikasna. Eterično ulje lavande (*Lavandula angustifolia* L.), cedra (*Cedrus* spp.), sandala (*Santalum* L.) i bergamota (*Citrus bergamia* Risso) primjeri su ulja s anksiolitičkim djelovanjem (36).

Kod aldehidnih eteričnih ulja smirujuće djelovanje je subjektivno. Za većinu ljudi eterično ulje limuna (*Citrus limon* (L.) Osbeck) je ugodnog mirisa, dok dio populacije miris eteričnih ulja poput limunske trave (*Cybopogon citratus* (DS.) Stapf) ili limunskog eukaliptusa (*Eucalyptus citriodora* Hook.) ne voli. Za olfaktorni učinak ovih eteričnih ulja na raspoloženje najvažniji je subjektivni doživljaj njihovih mirisa (37).

4.2.11. Analgetsko i protuupalno djelovanje

Eugenol iz klinčića (*Syzygium aromaticum* L.) i (-)-mentol iz paprene metvice (*Mentha piperita* L.) koriste se kao analgetici stoljećima. Eugenol se dugo vremena koristio kao analgetik u stomatologiji, a osim toga odličan je i lokalni antiseptik za usnu šupljinu. Eugenol svoj učinak ostvaruje preko TRPV-1 receptora. Blokadom receptora smanjuje se osjet boli i postiže antiseptički učinak (91).

(-)-Mentol iz paprene metvice (*Mentha piperita* L.), ali i drugih vrsta poznati je sastojak "hladnih gelova" za ublažavanje boli. Mentol djeluje putem aktivacije TRPM-8 receptora. Najpotentniji (-)-mentol je iz eteričnog ulja paprene metivce (*Mentha piperita* L.) i japanske metvice (*Mentha arvensis*) (92). Sintetički, (+)-mentol, manje je aktivan i lošijeg je mirisa. Derivati mentola, poput izomentola, neoizomentola i neomentola imaju slabiji učinak na TRPM-8 receptor (39).

1,8-Cineol postiže analgetski učinak djelujući na TRP receptore na nekoliko načina. Djeluje kao agonist (aktivira) TRPV-3 receptor koji stvara osjećaj topline (93). Na TRPM-8 receptor djeluje kao agonist, a na TRPA-1 receptor kao antagonist (94). Djelovanjem na ove receptore regulira se osjećaj hladnoće. Zbog ove neobične kombinacije djelovanja na TRPV-3 ("zagrijavanje" i analgetsko djelovanje), TRPM-8 (hlađenje i analgetsko djelovanje) i TRPA-1 (kočenje osjeta jake hladnoće) 1,8-cineol se koristi u reumatologiji dugi niz godina. Isto tako djelovanjem na TRP proteine 1,8-cineol ostvaruje i potuupalni učinak te je vrlo koristan kod upala u dišnom sustavu (40).

U eteričnom ulju njemačke kamilice (*Chamomilla recutita* L.) dominanti spojevi su bisabolol-oksidi. (-)-α-Bisabolol djeluje protuupalno, smanjuje proupalne faktore, upale u probavnom sustavu, upale kože i djeluje na hiperpigmentaciju kože. Molekularni mehanizam djelovanja (-)-α-bisabolola je nejasan (35).

U lokalnim pripravcima protiv boli nalazi se kamfor. Rijetko se primjenjuje prirodni, iz kamforovca (*Cinnamomu camphora* (L.) J.Presl), već se koristi sintetički, racemični. Nakon apliciranja na kožu, kamfor izaziva osjećaj hlađenja. Kao i mentol, kamfor se veže na TRPM-8, ali na drukčije vezno mjesto ili ga drukčije aktivira (95). Izazvana hladnoća je slabija nego nakon primjene mentola, no dovoljna za postizanje analgetskog učinka. Kamfor aktivira i TRPV-3 receptor putem kojeg se stvara osjećaj topline. Kamfor dakle, izaziva kombinaciju hlađenja i grijanja te uzrokuje vazodilataciju (širenje krvnih žila) na mjestu aplikacije. Zbog djelovanja na ova dva receptora, kamfor je popularan sastojak analgetičkih pripravaka (38).

Svjetski najpoznatija sastavnica eteričnog ulja s analgetskim učinkom je metil-salicilat. Mnogo vrsta u prirodi sintetizira ovaj spoj, ali najpoznatije je ulje zimzelena (*Gaultheria procumbens* L.). Metil-salicilat spada u skupinu spojeva salicilata. Strukture salicilne kiseline i metil-salicilata definirane su u XIX. stoljeću. Kako bi dobili lijek s manje nuspojava u odnosu na prirodne spojeve, kemičari su počeli modificirati strukturu salicilata. Francuski kemičar Charles Frédéric Gerhardt je 1853. godine sintetizirao acetil-salicilnu kiselinu u relativno nečistom obliku, a 1897. godine njemački kemičar Felix Hoffman iz tvrtke Bayer usavršio je sintezu acetil-salicilne kiseline te je 1899. godine stvoren planetarno popularni "Aspirin". Kemičar Arthur Eichengrün objavio je 1949. godine da je on zaslužan za otkriće "Aspirina". Tek je Walter Sneader ispravio ovu veliku povijesnu nepravdu 1999. godine. Osnovni mehanizam djelovanja salicilata, odnosno acetil-salicilne kiseline otkrili su

John Vane i Priscilla Piper 1970. godine. Naime, oni smanjuju razinu prostaglandina čime smanjuju upalu, bol i povišenu tjelesnu temperaturu. Godine 1979. utvrđeno je kako se inhibicija sinteze prostaglandina događa zbog inhibicije enzima ciklooksigenaze 1 i 2 te da acetil-salicilna kiselina inhibira oba enzima. No mehanizam djelovanja salicilne kiseline i metil-salicilata, nisu do danas potpuno objašnjeni. Dok Kurt Schnaubelt smatra da metil-salicilat inhibira ciklooksigenaze, Kasagami navodi metil-salicilat kao inhibitor enzima epoksid-hidrolaze. Taj enzim inhibira prirodne protuupalne spojeve epoksi-eikosatrienske kiseline (EET). Inhbicijom enzima raste količina EET i smanjuje se intenzitet upale (96). Ovo je vjerojatno mehanizam djelovanja putem kojeg metil-salicilat ostvaruje protuupalni učinak, dok je za analgetsko djelovanje zaslužan drugi mehanizam. Taj drugi mehanizam je najvjerojatnije aktivacija vaniloidnog receptora tipa 1 (TRPV-1) (97, 36).

4.2.12. Djelovanje na regeneraciju kože

U aromaterapiji eterično ulje mrkve (*Daucus carota* L.) koje sadrži seskviterpenske alkohole koristi se za poticanje regeneracije kože. Iako nema mnogo znanstvenih potvrda, ova primjena eteričnog ulja sjemena mrkve (*Daucus carota* L.) je vrlo česta. Ova upotreba se bazira na direktnom djelovanju na regeneraciju kože (cikatrizant - pospješuje zacjeljivanje rana, obnovu kože) i na antibakterijskom djelovanju (karotol i daukol). Eterično ulje sjemena mrkve ne sadrži karotenoide koji su najvažniji za regeneracijsko djelovanje macerata korijena mrkve. (-)-α-Bisabolol iz eteričnog ulja kamilice (*Matricaria chamomilla* L.) koristi se za regeneraciju kože zbog svog protuupalnog djelovanja (35). Također, eterična ulja bogata esterima dobri su cikatriznati i potpomažu regeneraciji kože. Na tržištu postoji mnogo dermokozmetičkih pripravaka s eteričnim uljem lavande (*Lavandula angustifola* Mill.) u formulacijama s biljnim uljima i maceratima koji doprinose regeneraciji kože (neven, brđanka, gospina trava) (36). Eterično ulje čajevca (*Maleleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) pospješuje zacjeljivanje rana, iako mehanizam kojim to ostvaruje nije poznat (36).

Eterično ulje smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil.) danas je vrlo popularno. U kozmetici se koristi zbog "anti-age" djelovanja i regeneracije kože. Također, eterično ulje smilja odlično je za tretiranje modrica. Eterično ulje smilja danas je osnovni sastojak

kozmetike za regeneraciju kože, brže zacjeljivanje manjih rana nakon operativnih zahvata, a kombinira se s biljnim uljima ploda divlje ruže, tamanua, maceratima nevena ili kantariona (38). Neka eterična ulja koja sadrže ketone poput ružmarina kemotip verbenon, širokolisne lavande i lavandina također su našli primjenu u kozmetologiji. Osim kao pomoć u regeneraciji kože, koriste se i za njegu mješovite kože te za regeneraciju manjih opekotina (38).

4.2.13. Djelovanje na dišni sustav

Verbenon se koristi u lijekovima i pripravcima koji djeluju kao mukolitici (otapaju polisaharidnu sluz i mijenjajuu njezina fizikalno-kemijska svojstva) i ekspektoransi (olakšavaju iskašljavanje). U ružmarinu kemotip verbenon (*Rosmarinus officinalis* L.) djelovanje ostvaruje u sinergiji s α-pinenom. Mehanizam djelovanja verbenona nije poznat, no zbog umirivanja nadražajnog kašlja i olakšavanja iskašljavanja koristi se kod infekcija donjeg dišnog sustava. Može se primijeniti u obliku supozitorija (čvrsti ili polučvrsti ljekoviti oblik pomoću kojeg se ljekovite tvari unose u tjelesne šupljine), dermalno i inhalacijski (38).

Anis i komorač stoljećima se u medicini koriste kao ekspektoransi odnosno za olakšavanje iskašljavanja. Na kašalj djeluju putem dva mehanizma. Spazmolitički djeluju na glatku muskulaturu bronha, olakšavaju disanje i smanjuju spazam izazvan kašljem. Potiču mukocilijarni transport i izbacuju višak sluzi iz dišnog sustava. Iako je mehanizam djelovanja još nepoznat, *E*-anetol se koristi u sirupima za kašalj. Djeluje na cilijarni endotel, poboljšava mu funkciju i olakšava uklanjanje viška sluzi (39).

Eterično ulje eukaliptusa globulusa (*Eucalyotus globulus* Labill.) je lijek za kašalj priznat i od Europskog znanstvenog komiteta za fitoterapiju (eng. European Scientific Cooperative on Phytotherapy, ESCOP), a koristi se dermalno, inhalacijski, rektalno i oralno (40).

Za liječenje infekcija u dišnom sustavu i simptomatsko liječenje kašlja koriste se i eterična ulja bogata 1,8-cineolom. Mehanizam djelovanja je složen. 1,8-Cineol povećava produkciju mucina (protein, sastojak mukusa) što je nepoželjno kod produktivnog, ali poželjno kod suhog kašlja (98). Također smanjuje aktivnost, ali povećava efikasnost

cilijarnog epitela. 1,8-Cineol smanjuje stvaranje upalnih medijatora što je vrlo poželjno (99). U kliničkim studijima provedenim na pacijentima s KOPB-om (kronična opstruktivna plućna bolest karakterizirana trajnim suženjem dišnh putova zbog emfizema ili kroničnog bronhitisa) primjena 1,8-cineola smanjila je frekvenciju egzacerbacija (pogoršanja) i poboljšala funkciju pluća mjerenu respiracijskim parametrima (100).

Lijek **Gelomyrtol forte** prisutan na našem tržištu, sadrži u svom sastavu 300 mg destilata mješavine od pročišćenog eukaliptusovog eteričnog ulja, pročišćenog eteričnog ulja slatke naranče, pročišćenog limunovog eteričnog ulja i pročišćenog eteričnog ulja mirte (66 : 32 : 1 : 1 m/m); ("mirtol standardizirani" s najmanje 75 mg limonena, 75 mg cineola i 20 mg α-pinena). Koristi za liječenje akutnog i kroničnog bronhitisa i rinitisa. U ovom lijeku prisutna je važna sinergija 1,8-cineola te ugljikovodika limonena i α-pinena (40).

4.2.14. Djelovanje na probavni sustav

Djelatna tvar eteričnog ulja kima (*Carvum carvi* L.) je (+)-*S*-karvon koji se stoljećima koristi za liječenje meteorizma (probavne nadutosti). Kao začin i preventivni lijek primjenjuje se u kulinarstvu s namirnicama koje mogu izazvati nadimanje. Karvon učinkovito djeluje na gljivice roda *Candida* sprječavajući stvaranje filamentoznih oblika kandide zbog čega ona gubi svoj patogeni potencijal (101). Isto tako karvon ima spazmolitičko djelovanje. (-)-*R*-karvon iz klasaste metvice ima jače spazmolitičko djelovanje nego (+)-*S*-karvon iz kima (102). Karvon potiče stvaranje mukusa. Upravo navedena tri djelovanja kima, spazmolitičko, antimikrobno i djelovanje na mukozu, zaslužna su za njegov karminativni učinak (38).

4.2.15. Estrogeno djelovanje

Biljke koje sadrže metoksifenol *E*-anetol koriste se u aromaterapiji kod menstrualnih tegoba i poremećaja menstrualnog ciklusa. *E*-anetol djeluje na estrogenske receptore bez učinka na druge receptore za spolne hormone (103). Isto tako ulje anisa se pokazalo učinkovitim kod menopauzalnih tegoba zbog čega je vrlo važno voditi računa o sinergiji ulja bogatih *E*-anetolom i γ-linolenskom kiselinom (39).

4.2.16. Insekticidno i repelentno djelovanje

Benzil-benzoat koji pripada kemijskoj grupi estera pokazuje instekticidno djelovanje na nekoliko vrsta. Djeluje na malene kukce vrste *Demodex folliculorum* i *Demodex brevis* koji žive u koži čovjeka i uzrokuju bolesti kao što je rozacea. Velika količina estera, od čega oko 30% benzil-benzoata, nalazi se u eteričnom ulju Peruanskog balzama i samom Peru balzamu. Danas je zaboravljen i ne koristi se zbog mogućih alergijskih reakcija na koži. Biljna vrsta *Cinnamomum sulhuratum* je jedina danas poznata biljka koja sadrži 80% benzil-benzoata, no njezino eterično ulje za sada nije komercijalno dostupno (36). Uz insekticidno djelovanje još važnije djelovanje eteričnih ulja je ono repelentno. Eterična ulja citronele, bogata aldehidima, koriste se u različitim repelentima, od dermalnih pripravaka do svijeća.

Aldehidi nisu jedini spojevi s repelentnim djelovanjem. Tu su i cikloeteri (oksidi), alkoholi, metoksifenoli i ugljikovodici. Različita eterična ulja djeluju na specifične vrste insekata. Sisanjem krvi člankonošci prenose različite patogene viruse, bakterije i protozoe. Zbog sprječavanja prijenosa malarije, virusa zapadnog Nila, chikungunya virusa, Hanta virusa, oni su veliki zdravstveni problem. Većina istraživanja je usmjerena na komarce, a rjeđe na druge vrste insekata. Kao najdjelotvornija eterična ulja pokazala su se ulje citronele, limunske trave, palmarose i đumbirske trave. Rod *Cymbopogon* kojem pripadaju navedena eterična ulja lako se uzgaja, prinos ulja je visok, a cijene na svjetskom tržištu su niske te su ekonomski prihvatljivi repelenti u zemljama u razvoju. Usporedbom eteričnog ulja iz *Cymbopogon winterianus* i vanilina te kemijskog spoja DEET-a (N,N-dietil-3-metil

benzamid) koji se nalazi u repelentima na tržištu nije uočena razlika u učinkovitosti (104). Kako bi se ostvarila što bolja učinkovitost eteričnog ulja kao repelenta potrebno ga je formulirati u hidrofilnu bazu s dugotrajnim otpuštanjem (105). Eterična ulja djeluju neurotoksično na insekte i tako ostvaruju repelentni učinak. Djeluju na receptore za GABA-u (γ-aminomaslačnu kiselinu) i oktopamin te inhibiraju enzim acetilkolin-esterazu. Djelovanjem na bilo koji od ovih neurotransmitera dolazi do smrti insekta (106).

Prilikom odabira eteričnog ulja za korištenje kao repelenta, treba paziti na ravnotežu između sigurnosti i djelotvornosti. Primjerice, eterično ulje kore cimetovca koje sadrži cimetni aldehid odličan je repelent, no zbog iritativnosti i alergijskih reakcija ne primjenjuje se. Poželjno je primjenjivati ulja koja ne sadrže velike količine aromatskih aldehida i fenola, već monoterpenske aldehide i alkohole. Koncentracija tj. udio eteričnog ulja ovisi o samoj formulaciji (37). Iako su za repelentno i insekticidno djelovanje većinom odgovorni aldehidi, alkohol *p*-metan-3,8-diol (PMD), trgovačkog naziva Citriodiol, poznati je repelent s komercijalnim uspjehom. Molekula PMD izolirana je iz eteričnog ulja limunskog eukaliptusa (*Eucalyptus citriodora* = *Corymbia citriodora* ssp. *citriodora*). Iako je malog udjela u ulju u odnosu na citronelal, nosioc je repelentnog djelovanja. U SAD-u i EU, PMD se dobiva iz biomase nakon destilacije eteričnog ulja (44). PMD ima manje izražen aldehidni (limunasti miris), miriše na mentol, vrlo blago hladi kožu. PMD osim na komarce, djeluje i na krpelje. U komercijalnim pripravcima PMD se kombinira s drugim molekulama koje djeluju kao repelenti da bi se postigao sinergistički učinak. To su primjerice spojevi iz lavande, lavandina, geranija. PMD je molekula s 3 kiralna centra, a najaktivnija je ona koja se biosintezom pomoću enzima stvara u biljkama. Sintetička molekula slabije je aktivnosti, stoga je dobivanje iz biljne mase kao sirovine vrlo važno (107, 43).

4.2.17. Djelovanje na metaboličke puteve

Farnezol se u organizmu čovjeka veže na farnezoid X receptor i PPAR-α . Farnezoid X receptor veže žučne soli i kontrolira njihovu razgradnju. Njegovom aktivacijom smanjuje se aktivnost enzima citokroma 7A1 koji oksidira kolesterol u žučne kiseline, a ako je koncentracija žučnih kiselina u jetri iznad određene granice veže višak i sprječava daljnju

sintezu želučanih kiselina. Zbog ovog učinka moguć je blagi porast kolesterola. Epitelne stanice crijeva štiti od pretjeranog umnožavanja bakterija, potiče regeneraciju jetre i snižava razinu šećera. Zbog kinetike samog farnezola, eterična ulja bogata farnezolom nisu pronašla primjenu u farmakologiji (35).

5. Rasprava

Popularnost aromaterapije i primjene eteričnih ulja neprestano raste. Ovim diplomskim radom nastojalo se obuhvatiti što veći broj dostupnih, relevantnih podataka o kemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti eteričnih ulja.

Eterična ulja su prirodni spojevi nastali kao sekundarni metaboliti biljaka. Sastav eteričnih ulja određuje se tankoslojnom kromatografijom (TLC), tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) ili vezanom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). GC-MS je najčešće korištena tehnika analize eteričnih ulja jer objedinjuje plinsku kromatografiju (separacija i kvantifikacija) i spektrometriju masa (kvalitativno određivanje i analiza pojedinačnih sastojaka). Terpeni su vrlo česte komponente eteričnih ulja. Ovisno o broju vezanih izoprenskih jedinica, razlikuju se monoterpeni, seskviterpeni i diterpeni. U monoterpenske alkohole i fenole koji se mogu pronaći u eteričnim uljima spadaju timol, karvakrol i (-)-mentol i dr., a u seskviterpene farnezol, (-)-α-bisabolol i dr. Uz terpene, u sastavu eteričnih ulja nalaze se i fenilpropanski derivati (npr. eugenol) i drugi spojevi. Uz alkohole i fenole, esteri kao npr. linalil-acetat i dr. dominantne su komponene određenih eteričnih ulja. Od aldehida najznačajniji su geranial, neral, *trans*-cimetni aldehid i citronelal. Neka eterična ulja su toksična npr. eterično ulje miloduha zbog prisutnosti ketona. Najpoznatiji metoksifenoli su estragol (metilkavikol) i *E*-anetol. 1,8-Cineol koji se nalazi u mnogim eteričnim uljima, najznačajniji je predstavnik cikloetera. Kemijski sastav eteričnih ulja određuje njihovu biološku aktivnost.

Zbog svoje topljivosti u lipidima, eterična ulja lako prodiru kroz fosfolipidni dvosloj stanične membrane bakterija i ostvaruju antimikrobni učinak. Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja najčešće se ispituje metodama difuzije (disk difuzija) ili dilucije (razrjeđivanje agara ili bujona). Za ispitivanje sinergističkog ili antagonističkog djelovanja eteričnih ulja koriste se metode Checkerboard, E-test, Time-kill metoda. Primjerice, na bakteriju *Escherichia coli* baktericidno djeluju eugenol, karvakrol, cimetni aldehid, timol i (+)-karvon. Eterično ulje matičnjaka učinkovito je na multirezistentnom soju *Shigella sonei* i na gljivicama *Trichophyton* vrsta. Na *Listeria monocytogenes* baktericidno djeluju eugenol i cimetni aldehid.

Na viruse djeluju eterična ulja bogata alkoholima, cikloeterima (oksidima), ali i aldehidima. Tako npr. 1,8-cineol djeluje na virusne infekcije u dišnom sustavu, a na virus herpesa djeluju eterično ulja matičnjaka ili limunske trave.

Antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja može se dokazivati mnogim metodama, ali DPPH metoda je najčešće korištena. Eterična ulja origana i kadulje, vrsta *Origanum onites* L. i *O. indercendes* te ulja *Salvia officinalis* L. i *Salvia fructicosa* Mill., djeluju antioksidacijski kao i eterično ulje iz lišća sirijskog origana (*Origanum syriacum*), eterična ulja *Thymus vulgaris* L., *Ocimim basilicum* L. i *Origanum vulgare* L. te *Melissa officinalis* L.

U liječenju anksioznosti (tjeskobe) kao aditivna ili suportivna terapija mogu se primjenjivati eterična ulja lavande, cedra, sandala i bergamonta. Kod aldehidnih ulja, njihov limunast miris kod pojedinaca djeluje smirujuće, dok kod nekih imaju suprotan učinak.

Analgetsko djelovanje postižu mnoga eterična ulja. Eugenol iz klinčića koristio se kao analgetik i antiseptik u stomatologiji. Kao sastojak gelova za hlađenje i smanjivanje boli koristi se (-)-mentol iz paprene metvice, ali i drugih vrsta. U lokalnim pripravcima za bol često se nalazi i kamfor koji izaziva kao i mentol osjećaj hlađenja, ali i stvara blagi osjećaj topline i izaziva vazodilataciju na mjestu primjene. Najpoznatija sastavnica eteričnih ulja s analgetskim učinkom je svakako metil-salicilat koji spada u skupinu salicilata kao i planetarno popularni "Aspirin".

Eterična ulja imaju značajnu primjenu u kozmetologiji. Osim u proizvodnji parfema, koriste se i za njegu kože. Seskviterpenski alkoholi iz eteričnog ulja mrkve potiču regeneraciju kože kao i (-)-α-bisabolol iz eteričnog ulja njemačke kamilice. Eterična ulja bogata esterima dobri su cikatrizanti i potpomažu regeneraciji kože. Eterično ulje lavande u kombinaciji s drugim biljnim uljima i maceratima nalazi se u brojnim dermokozmetičkim pripravcima. Eterično ulje čajevca pospješuje zacjeljivanje rana, a smilja djeluje "anti-age", regenerira kožu i smanjuje modrice. Ketoni iz eteričnih ulja kao verbenon pomažu u regeneraciji kože i manjih opeklina te njezi mješovite kože.

U medicinske svrhe verbenon se primjenjuje zbog svog mukolitičkog i ekspektorirajućeg djelovanja. Eterična ulja anisa i komorača olakšavaju iskašljavanje. Za liječenje kašlja koriste se i eterično ulje eukaliptusa globulusa (*Eucalyotus globulus* Labill.) i 1,8-cineol.

(+)-*S*-karvon iz eteričnog ulja kima koristi se stoljećima kao karminativ. *E*-anetol koristi se u aromaterapiji kod menstrualnih tegoba i poremećaja menstrualnog ciklusa. Ulje anisa se pokazalo učinkovitim kod menopauzalnih tegoba.

Repelentno i insekticidno djelovanje nekih sastavnica eteričnih ulja povećava njihov značaj u svakodnevnoj primjeni. Najznačajnije djeluju protiv komaraca. Eterično ulje citronele, limunske trave, palmarose i đumbirske trave najučinkovitiji su. Eterično ulje kore cimetovca iako je djelotvorno zbog mogućih alergijskih reakcija se ne primjenjuje. Benzil-benzoat koji pripada kemijskoj grupi estera pokazuje insekticidno djelovanje na malene kukce vrste *Demodex folliculorum* i *Demodex brevis* koji žive u koži čovjeka.

Prilikom primjene eteričnih ulja važno je biti oprezan zbog njihovih mogućih štetnih učinaka. Naime, eterično ulje bergamota sadrži fotoaktivnu molekulu bergapten (5-metoksipsolaren) koja uslijed izlaganja i apsorpcije sunčeve energije može dovesti do oštećenja stanice. Isto tako, neka eterična ulja odnosno njihove komponenete pokazuju svojstva kancerogenosti ili mutagenosti. Primjerice, reakcijama metabolizma safrol, estragol i metileugenol postaju genotoksični. Utjecajem na jetreni citokrom P450 aristološka kiselina, bergamoten i dr. djeluju kancerogeno.

Suprotno tome, neka eterična ulja djeluju antimutageno kao npr. eterično ulje *Cinammomum cassia,* eterično ulje kamilice s glavnom sastavnicom α-bisabololom, eterično ulje lavande ili kadulje.

6. Zaključak

Eterična ulja se danas najviše primjenjuju u kozmetologiji, za proizvodnju dermatokozmetičkih pripravaka i parfema, zbog svog repelentnog i insekticidnog djelovanja u svijećama i drugim pripravcima za zaštitu od kukaca ponajprije komaraca, kao začini i konzervansi u prehrambenoj industriji te u farmakologiji (ioako često toga nismo ni svjesni). Svima poznati dodatak, najčešće pekarskim proizvodima, kim, ima stoljećima poznato karminativno djelovanje. Mentol i metil-saliciat poznati su analgetici i sastojci mnogih lokalnih analgetskih preparata. Ono što je važno za budućnost je antimikrobna aktivnost eteričnih ulja budući da rezistencija mnogih bakterija raste, a time antibiotici više nemaju učinkovitost kao prije. Također, broj malignih oboljenja je sve veći, a neka eterična ulja mogla bi i tu naći svoju potencijalnu primjenu. Potencijal eteričnih ulja u medicinske svrhe je veliki i trebao bi se više istraživati.

7. Popis citirane literature

1. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem Toxicol. 2008;446–475.

2. Burt SA, Vlielander R, Haagsman HP, Veldhuizen EJA. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. J Food Prot. 2005;919–26.

3.Woehrlin F, Fry H, Abraham K, Preiss-Weigert A. Quantification of flavoring constituents in cinnamon: high variation of coumarin in cassia bark from the German retail market and in authentic samples from Indonesia. J Agric Food Chem. 2010;10568–75.

4. Moon SE, Kim HY, Cha JD. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. Arch Oral Biol. 2011;907–16.

5. [Internet] [pristupljeno:15.5.2018.]; Dostupno na: http://essentialoilsacademy.com/history/

6. [Internet] [pristupljeno:15.5.2018.]; Dostupno na: https://archive.org/stream/essentialoilsvol030201mbp/essentialoilsvol030201mbp_djvu.txt

7. Mendoza-Yepes MJ, Sanchez-Hidalg LE, Maertens G, Marin-Iniesta F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) en Spanish soft cheese. J Food Saf. 1997;47– 55.

8. Hajhashemi V, Ghannadi A, Sharif B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. J. Ethnopharmacol. 2003;67–71.

9. Yoo CB, Han KT, Cho KS, Ha J, Park HJ, Nam JH, i sur. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Cancer Lett. 2005;41-52.

10. Sylvestre M, Legault J, Dufour D, Pichette A. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. Phytomedicine. 2005;299–304.

11. Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F, Legault J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. J. Ethnopharmacol. 2006;99–102.

12. Carnesecchi S, Bras-Gon R, Bradaia A, Zeisel M, Gosse´ F, Poupon MF, Raul F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. Cancer Lett. 2004;53–59.

13. Czarnecka AM, Golik P, Bartnik E. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. J. Appl. Genet. 2006;67–78.

14. [Internet]. [pristupljeno: 17.5.2018.]; Dostupno na: http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kontrola-kvalitete-etericnih-ulja-2/

15. [Internet] [pristupljeno: 11.9.2018.] Dostupno na: http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/laboratorijska-dijagnostika-zaraznih-bolesti/ispitivanje-osjetljivosti-antibiogram)

16. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. Antimicrob Agents Chemother. 1996;1914–18.

17. Bhat AS, Ahangar AA. Methods for detecting chemical-chemical interaction in toxicology. Toxicol Mech Meth. 2007;441–50.

18. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combination. J Biosci Med. 2016.

19. Lehtinen J, Lilius EM. Promethazine renders *Escherichia coli* susceptible to penicillin G: real-time measurement of bacterial susceptibility by fluoro-luminometry. Int J Antimicrob Agents. 2007;44.

20. Rastogi N, Goh KS, Wright EL, Barrow WW. Potential drug targets for *Mycobacterium avium* defined by radiometric druginhibitor combination techniques. Antimicrob Agents Chemother. 1994;2287–95.

21. Abulrob A-N, Suller MTE, Gumbleton M, i sur. Identification and biological evaluation of grapefruit oil components as potential novel efflux pump modulators in methicillin-resistant *Staphylococcu aureus* bacterial strains. Phytochemistry. 2004;3021–7.

22. Kollanoor Johny AK, Hoagland T, Venkitanarayanan K. Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multidrug-resistant

Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. Foodborne Pathogens Dis. 2010;1165–70.

23. Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. J Ethnopharmacol. 1988;127– 149.

24. Barry, A.L. . The Antimicrobic Susceptibility Test: Principles and Practices. Lea and Febiger, Philadelphia. 1976.

25. Shelef LA. Antimicrobial effects of spices. J F Saf. 1984;29-44.

26. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol. 2004;223– 253.

27. Pravdić M. Kemijska i biološka aktivnost meda manuke. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet; 2017.

28. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. Biochem & Anal Biochem. 2011.

29. Živko J. Određivanje antioksidativnog učinka, ukupnih fenola i tanina u plodu rogača. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet; 2012.

30. Jerković I, Radonić A. Praktikum iz organske kemije. Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2009.

31. Luterott S. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). [pristupljeno 20.5.2018.]. Dostupno na: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm

32. Tegetelija A. Određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima primjenom GC-MS metode. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet; 2015/2016.

33. Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N., 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. Science. 2006;808–11.

34. [Internet]. [pristupljeno 22.5.2018.]. Dostupno na: http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/monoterpenski-alkoholi-i-fenoli-2/

35. [Internet]. [pristupljeno 22.5.2018.]. Dostupno na: http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/seskviterpenski-i-diterpenski-alkoholi-i-fenoli-2/

36. [Internet]. [pristupljeno 22.5.2018.]. Dostupno na: http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/esteri-2/

37. [Internet]. [pristupljeno 22.5.2018.]. Dostupno na: http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/aldehidi-2/

38. [Internet]. [pristupljeno 22.5.2018.]. Dostupno na: http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/ketoni-2/

39. [Internet]. [pristupljeno 22.5.2018.]. Dostupno na: http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/metoksifenoli-2/

40. [Internet]. [pristupljeno 22.5.2018.]. Dostupno na: http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/cikloeteri-oksidi-2/

41. Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J Essen Oil Res. 1989;119–28.

42. Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol. 2002;1561–68.

43. Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham JL, Bell HC, Wyllie SG, i sur. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Lett Appl Microbiol. 1998;194–98.

44. Richter C, Schlegel J. Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. Toxicol Lett. 1993;119–27.

45. Di Pasqua R, Hoskins N, Betts G, Mauriello G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. J Agric Food Chem. 2006;2745–49.

46. Parveen M, Hasan MK, Takahashi J, Murata Y, Kitagawa E, Kodama O, i sur. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. J Antimicrob Chemother. 2004;46–55.

47. Ultee A, Kets EP, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Arch Microbiol. 2000;233–38.

48. Longbottom CJ, Carson CF, Hammer KA, Mee BJ, Riley TV. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energydependent cellular processes. J Antimicrob Chemother. 2004;386–92.

49. Dijoux N, Guingand Y, Bourgeois C, Durand S, Fromageot C, Combe C, i sur. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. Toxicol in vitro. 2006;480–89.

50. Averbeck D, Averbeck S, Dubertret L, Young AR, Morlie`re P. Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. J Photochem Photobiol. 1990;209–29.

51. Franzios G, Mirotsou M, Hatziapostolou E, Kral J, Scouras ZG., Mavragani-Tsipidou P. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. J Agric Food Chem. 1997;2690–94.

52. Hasheminejad G, Caldwell J. Genotoxicity of the alkenylbenzenes a- and b-asarone, myristicin and elimicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. Food Chem Toxicol. 1994;223–31.

53. Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alakomi HL, von Wright A. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food Chem Toxicol. 1999;813–23.

54. Maralhas A, Monteiro A, Martins C, Kranendonk M, Laires A,v Ruef J, i sur. Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. Mutagenesis. 2006;199–204.

55. Conner DE, Beuchat LR, Worthington RE, Hitchcock HL. Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. Inter J Food Microbiol. 1948;63–74.

56. Abrahim D, Francischini AC, Pergo EM, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL. Effects of a-pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. Plant Physiol Biochem. 2003;985–91.

57. Guba R. Toxicity myths – essential oils and their carcinogenic potential. Int J Aromather. 2001;76–83.

58. Averbeck D, Averbeck S, Dubertret L, Young AR, Morlie`re P. Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. J Photochem Photobiol. 1990;209–29.

59. Averbeck D, Averbeck S. DNA photodamage, repair, gene induction and genotoxicity following exposures to 254 nm UV and 8-methoxypsoralen plus UVA in a eukaryotic cell system. Photochem Photobiol. 1998;289–95.

60. Zhou S, Koh HL, Gao Y, Gong ZY, Lee EJ. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. Life Sci. 2004;935–68.

61. Miller EC, Swanson AB, Phillips DH, Fletcher TL, Liem A, Miller JA. Structure–activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and syntheticalkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. Cancer Res. 1983;1124–34.

62. Shankel DM, Kuo S, Haines C, Mitscher LA. Extracellular interception of mutagens. Basic Life Sci. 1987;65–74.

63. Hartman PE, Shankel DM. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. Environ Mol Mutagen. 1990;145–82.

64. Kuo ML, Lee KC, Lin JK. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3- carbinol in the *Salmonella* and CHO systems. Mutat Res. 1992;87–95.

65. Hernandez-Ceruelos A, Madrigal-Bujaidar E, de la Cruz C. Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. Toxicol Lett. 2002;103–10.

66. Gomes-Carneiro MR, Dias DMM, De-Oliveira ACAX, Paumgartten FJR. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of a-bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. Mutat Res. 2005;105–12.

67. Evandri MG, Battinelli L, Daniele C, Mastrangelo S, Bolle P, Mazzanti G. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. Food Chem Toxicol. 2005;1381–87.

68. Vukovic-Gacic B, Nikcevic S, Beric-Bjedov T, Knezevic-Vukcevic J, Simic D. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chem Toxicol. 2006;1730–38.

69. Mezzoug N, Elhadri A, Dallouh A, Amkiss S, Skali NS, Abrini J, i sur. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. Mutat Res. 2007;100–10.

70. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Zhiri A, Baudoux D, Idaomar M. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. Mutat Res. 2006;27–38.

71. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. DNA Repair 5. 2006;145–52.

72. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. Antioksidansi; [ažurirano 25.03.2013; pristupljeno 23.05.2018.]. Dostupno na: https://hr.wikipedia.org/wiki/Antioksidansi

73. Pizzale L, Bortolomeazzi R, Vichi S, U¨ beregger E, Conte LS. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. J Sci Food Agr. 2002;1645–1651.

74. Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. Biol Pharm Bull. 2003;1725–29.

75. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) essential oil. J. Agric. Food Chem. 2004;2485–89.

76. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. J Agric Food Chem. 2006;1822–28.

77. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, i sur. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. Food Chem Toxicol. 1994;31–36.

78. Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. Eur J Pharmacol. 2006;51–64.

79. Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. Biol Pharm Bull. 2003;1725–29.

80. Gill AO, Holley RA. Disruption of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *L. sakei* cellular membranes by plant essential oils aromatics. Int J Food Microbiol. 2006;1–9.

81. Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. Int J Food Microbiol. 2006;170–4.

82. Becerril R, Nerin C, Gomez-Lus R. Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. Foodborne Pathogens. 2012;699–705.

83. Fadli M, Saad A, Sayadi, S, i sur. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. Phytomedicine. 2012;464–71.

84. Fadli M, Chevalier J, Saad A, i sur. Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents. 2011;325–30.

85. Rastogi N, Goh KS, Horgen L, Barrow WW. Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and trans-cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbio. 1998;149–57.

86. Koto R, Imamura M, Watanabe C, Obayashi S, Shiraishi M, Sasaki Y, Azuma H. Linalyl acetate as a major ingredient of lavender essential oil relaxes the rabbit vascular smooth muscle through dephosphorylation of myosin light chain. J Cardiovasc Pharmacol. 2006;850-6.

87. You JH, Kang P, Min SS, Seol GH. Bergamot essential oil differentially modulates intracellular Ca2+ levels in vascular endothelial and smooth muscle cells: a new finding seen with fura-2. J Cardiovasc Pharmacol. 2013;324-8.

88. Kuwahata H, Komatsu T, Katsuyama S, Corasaniti MT, Bagetta G, Sakurada S i sur. Peripherally injected linalool and bergamot essential oil attenuate mechanical allodynia via inhibiting spinal ERK phosphorylation. Pharmacol Biochem Behav. 2013;735-41.

89. Reiter M, Brandt W. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. Arzneimittelforschung. 1985;408-14.

90. Siqueira R, Leal-Cardoso J, Couture R, Lahlou S. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil of croton zehntneri leaves in anaesthetized rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006;238-47.

91. Park CK, Kim K, Jung SJ, Kim MJ, Ahn DK, Hong SD i sur. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. Pain. 2009;84-94.

92. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM i sur. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. Cell. 2002;705-15.

93. Sherkheli MA, Benecke H, Doerner JF, Kletke O, Vogt-Eisele AK , Gisselmann G, i sur. Monoterpenoids Induce Agonist-Specific Desensitization of Transient Receptor Potential Vanilloid-3 ion Channels. J Pharm Pharmaceut Sci. 2009;116 – 28.

94. Takaishi M, Fujita F, Uchida K, Yamamoto S, Sawada (Shimizu) M, Hatai (Uotsu) C i sur. 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. Mol Pain. 2012;86.

95. Selescu T, Ciobanu AC, Dobre C, Reid G, Babes A. Camphor activates and sensitizes transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) to cooling and icilin. Chem Senses. 2013;563-75.

96. Kasagami T, Kim IH, Tsai HJ, Nishi K, Hammock BD, Morisseau C. Salicylate–urea-based soluble epoxide hydrolase inhibitors with high metabolic and chemical stabilities. Bioorg Med Chem Lett. 2009;1784-89.

97. Ohta T, Imagawa T, Ito S. Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 in Analgesic Action of Methylsalicylate. Mol Pharmacol. 2009;307-17.

98. Abanses JC, Arima S, Rubin BK. Vicks VapoRub induces mucin secretion, decreases ciliary beat frequency, and increases tracheal mucus transport in the ferret trachea. Chest. 2009;143-48.

99. Riechelmann H, Brommer C, Hinni M, Martin C. Response of human ciliated respiratory cells to a mixture of menthol, eucalyptus oil and pine needle oil. Arzneimittelforschung. 1997;1035-9.

100. Worth H, Schacher C, Dethlefsen U. Concomitant therapy with Cineole (Eucalyptole) reduces exacerbations in COPD: a placebo-controlled double-blind trial. Respir Res. 2009;69.

101. McGeady P, Wansley DL, Logan DA. Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. J Nat Prod. 2002;953-5.

102. Souza FV, da Rocha MB, de Souza DP, Marçal RM. (-)-Carvone: antispasmodic effect and mode of action. Fitoterapia. 2013;20-4.

103. Tabanca N, Khan SI, Bedir E, Annavarapu S, Willett K, Khan IA i sur. Estrogenic activity of isolated compounds and essential oils of *Pimpinella* species from Turkey, evaluated using a recombinant yeast screen. Planta Med. 2004;728-35.

104. Tawatsin A, Wratten SD, Scott RR, Thavara U, Techadamrongsin Y. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. J Vector Ecol. 2001;76-82.

105. Oyedele AO, Gbolade AA, Sosan MB, Adewoyin FB, Soyelu OL, Orafidiya OO. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil. Phytomedicine. 2002;259-62.

106. Regnault-Roger C, Vincent C, Arnason JT. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. Annu Rev Entomol. 2012;405-24.

107. Drapeau J, Rossano M, Touraud D, Obermayr U, Geier M, Rose A, Kunz W. Green synthesis of *para*-Menthane-3,8-diol from *Eucalyptus citriodora*: Application for repellent products. C R Chim. 2011;629-35.

8. Sažetak

Eterična ulja su više ili manje složene smjese prirodnih spojeva, produkti metabolizma biljaka. Hlapljivi su te se zbog toga najčešće izdvajaju procesom destilacije. Ispitivanja kvalitete eteričnih ulja i zahtjevi za kakvoću pojedinog ulja, navedena su u monografijama Farmakopeje ili AFNOR/ ISO normama.

Eterično ulje sadrži veliki broj spojeva. U kemijskom sastavu obično dominiraju dvije ili više komponenti, dok su ostale prisutne u tragovima. U kemijski sastav ulaze terpeni (mono- ili seskvi-terpeni), fenilpropanski derivati i ostali spojevi.

Biološka aktivnost eteričnih ulja ovisi o njihovom kemijskom sastavu Zbog svoje lipofilnosti eterična ulja lako prolaze fosfolipidni dvosloj stanične membrane mnogih bakterija i gljivica te ostvaruju antimikrobno djelovanje. Na više načina eterična ulja djeluju citotoksično na stanice. Mogu mijenjati propusnost stanične membrane za ione, ometati rad ATP crpke i dovoditi do energetskog deficita, mijenjati sastav membrane ili povećavajati njezinu fluidnost. Neka eterična ulja su potencijalno toksična. Eterično ulje bergamota sadrži molekulu bergaptena koja se uslijed izlaganja sunčevoj energiji aktivira u oblike koji dovode do oštećenja stanice. Mnogim eteričnim uljima, tj. njihovim glavnim komponentama (npr. bergapten, safrol) ispituje se utjecaj na genetski materijal i stvaranje mutacija, odnosno njihova mutagenost i kancerogenost. S druge strane, eterično ulje kamilice ili često korišten začin cimet pokazuju svojstva "dezmutagena" koji štite od mutageneze. Eterična ulja s terpenoidima i fenolima poput kaduljinog ili origanovog, štite stanice od oksidacijskog stresa. Zbog svog antivirusnog djelovanja 1,8-cineol vrlo je popularan u liječenju infekcija dišnih puteva kao i druga eterična ulja s aldehidima koji su odgovorni za antivirusni učinak. Eterično ulje lavande djeluje anksiolitički i spazmolitički. Kao analgetici stoljećima se primjenjuju klinčić (eugenol je djelatna komponenta) i paparena metvica ((-)-mentol je djelatna komponenta). Eterična ulja bogata 1,8-cineolom, eterično ulje eukaliptusa globulusa, ružmarina, anisa i komorača našli su primjenu u liječnju kašlja jer djeluju kao ekspektoransi i mukolitici. Eterično ulje kima poznato je po svom učinku u probavnom sustavu i ublažavanju nadutosti. Eterična ulja citronele koriste se zbog svog repelentnog djelovanja. Mnoga eterična ulja imaju primjenu u kozmetici, pospješuju regeneraciju kože, uklanjaju ožiljke, daju specifične note parfemima. Osim u kozmetologiji, danas su eterična ulja popularna i kao začini i konzervansi u prehrambenoj industriji.

Zbog mnogih navedenih poznatih učinaka, eterična ulja i njihove glavne komponente postaju značajni predmeti znanstvenih istraživanja i primjene u svakodnevnom životu.

9. Summary

Essential oils are more or less complex mixtures of natural compounds, products of plant metabolism. They are volatile and are therefore most often isolated by the distillation process. Tests of quality essential oils and requirements for the quality of individual oils are listed in the monographs Pharmacopoeia or AFNOR / ISO norms.

Essential oils contain a large number of compounds. The chemical composition is usually dominated by two or more components, while others are traceable. The chemical composition includes terpenes (mono- or sesquiterpene), phenylpropane derivatives, and other compounds.

Biological activity of the essential oils depends on their chemical composition. Because of their lipophilicity they easily pass the phospholipid bilayer cell membranes of many bacteria and fungi and exhibit antimicrobial activity. In many ways the essential oils act cytotoxic to the cells. They can change ion band membrane permeability, interfere with ATP pump operation, and lead to energy deficit, change membrane composition, or increase its fluid flow. Some essential oils are potentially toxic. Bergamot oil contains a psoralen molecule called bergapten which, due to the exposure to sunlight, activates into forms that cause cell damage. Many essential oils, or their major components (ex. bergapten, safrol) are investigating due to their effect on genetic material and the formation of mutations (mutagenicity and carcinogenicity). On the other hand, camomile oil or frequently used cinnamon oil exhibit "mutagenesis-deficient" dismutase properties. Essential oils with terpenoids and phenols such as sage or oregano oil, protect the cells from oxidative stress. Because of its antiviral activity, 1,8-cineole is very popular in the treatment of respiratory infections as well as other essential oils with aldehydes that are responsible for the antiviral effect. Lavender oil acts anxiolytically and spasmolytically. As analgesics for centuries are used cloves (eugenol is an active component) and peppermint ((-)-menthol is an active component). Essential oils rich in 1,8-cinneol like oils of the eucalyptus globulus, rosemary, anise, and fennel are used in the treatment of cough because of the action as expectorants and mucolytics. Cumin oil is known for its effect on the digestive system and the suppression of the overgrowth. Citrus oils are used because of their repulsive activity. Many essential oils have application in cosmetics, improve regeneration of the skin, remove scars, give special note to perfumes. Except for cosmetology, today's essential oils are popular as spices and preservatives in the food industry.

Due to many of known effects, essential oils and their major ingredients become important subjects of scientific research and application in everyday life.

10. Životopis

Dora Štefanac rođena je 14. siječnja 1994. godine u Bjelovaru.

Osnovnu školu, IV. osnovna škola Bjelovar, pohađala je od 2001. do 2009. godine. Tijekom osnovne škole sudjeluje u mnogim školskim i županijskim natjecanjima. Istodobno, pohađala je školu stranog jezika. Glazbenu školu Vatroslava Lisinskog pohađala je od 2003. do 2009. godine i svirala obou. Aktivno je trenirala taekwondo i osvojila mnoga odličja. 2005. godine osvojila je 3. mjesto na prvenstvu Republike Hrvatske i proglašena 3. najboljom sportašicom grada Bjelovara u kategoriji kadetkinja. Od 2012.godine nosilac je crnog pojasa.

Opću gimnaziju Bjelovar upisala je 2009. godine. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelovala je u natjecanjima iz kemije, matematike i biologije. Ostvarivši odličan rezultat tijekom sve 4 godine pohađanja srednje škole, 2013. godine upisala je Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija u Splitu. 2016. godine dobila je Dekanovu nagradu za postignute izvrsne rezultate tijekom studiranja. Od ožujka do rujna odradila je stručno osposobljavanje u ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, u ljekarničkoj jedinici Trstenik. Završni ispit stručnog osposobljavanja položila je 5. rujna 2018. godine.