

UTVRĐIVANJE HEMIJSKOG SASTAVA ETERIČNOG ULJA ČETINARA I ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI NJIHOVE PRIMJENE U INDUSTRIJI

Željka Marjanović-Balaban, P. Miletić

Rezime

Republika Srpska raspolaže velikim potencijalom drvnog zelenila četinarara kao moguće sirovine za proizvodnju eteričnog ulja. Zbog toga su cilj i zadaci ispitivanja usmjereni ka definisanju hemijskog sastava kao i antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja analiziranih eteričnih ulja četinarara (jele, smrče, bora, kleke i duglazije). Sadržaj pojedinih komponenti ulja (hemijski sastav) određen je primjenom gasne hromatografije (GC) i visokopritisne tečne hromatografije (HPLC). Sa ciljen praćenja antioksidativnog djelovanja eteričnog ulja različitih vrsta ispitanih četinarara utvrđene su vrijednosti peroksidnog broja. Antimikrobno djelovanje pojedinih eteričnih ulja ispitano je na *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella enteritidis*. Upoređeno je i antimikrobno djelovanje eteričnih ulja sa referentnim antibioticima, a sve u cilju ispitivanja mogućnosti primjene ovih ulja u farmaceutskoj industriji i u prehrambenoj industriji kao "prirodnih konzervansa".

Ključne riječi: eterično ulje, četinarari, hemijske karakteristike, antioksidativno djelovanje, antimikrobno djelovanje, primjena u industriji

Uvod

Mnoge biljne sirovine vijekovima su se koristile kao sredstvo za liječenje različitih vrsta oboljenja. Biljni preparati u farmaceutskim oblicima namijenjenim za oralnu i vanjsku primjenu pokazuju širok spektar djelovanja, među kojima je jedno od najvažnijih antimikrobno. Djelovanje takvih biljnih preparata na različite mikroorganizme predmet je mnogih današnjih naučnih istraživanja, koja su najviše potaknuta činjenicom da je velika upotreba antibiotika tokom više od pola stoljeća dovela do rezistencije mikroorganizama. Obogaćeni novim rezultatima i saznanjima o hemizmima i djelotvornosti aktivnih komponenti dobijenih iz biljaka, danas nailazimo na sve veću primjenu ljekovitog bilja u različitim granama industrije.

Budući da naši prostori posjeduju izuzetno bogatu floru, trebalo bi razmotriti mogućnost intenzivne proizvodnje eteričnog ulja i njegove primjene u industriji. Od sirovina za dobijanje eteričnog ulja u Republici Srpskoj pogodnim se smatraju jela, smrča, bor, kleka i duglazija. Ovi četinarari predstavljaju osnovnu sirovinsku bazu koja bi se mogla iskoristiti za industrijsku proizvodnju eteričnog ulja.

O eteričnom ulju ovih četinarara sa područja Bosne i Hercegovine ima veoma malo podataka i oni se uglavnom odnose na prinose eteričnog ulja [21]. Potrebno je naglasiti da postoji niz faktora koji utiču na prinos, odnosno kvantitativne karakteristike, i da znatnu ulogu ima godišnje doba kada se uzimaju uzorci za analizu. Dosadašnja ispitivanja su sa sigurnošću pokazala da se dobije znatno veći prinos izdvojenog eteričnog ulja ukoliko se četine uzorkuju u jesen, u vrijeme i pred kraj vegetacionog perioda, u odnosu na zimu i proljeće. Različiti kvantitativni prinos prate i drugačije kvalitativne karakteristike izdvojenog eteričnog ulja [19].

Kod nas se u šumarstvu za sada koriste samo stablo i krupna granjevina. Sitna granjevina i iglice kao nus proizvod u eksploataciji ostaju u šumi, a to je upravo sirovina za dobijanje eteričnog ulja.

Iz prakse je poznato da kod drveta srednjeg uzrasta krošnja zauzima samo dio ukupnog nadzemnog dijela drveta, od koje se za dobijanje eteričnog ulja mogu koristiti sljedeći dijelovi krošnje: iglice, šišarke, izdanci, grančice prečnika 1 cm i grančice prečnika 1-4 cm. To iznosi čak 57% mase krošnje drveta koja se može koristiti za dobijanje eteričnog ulja. Pri tome treba imati u vidu da masa krošnje četinara obuhvata 19-21% ukupne mase nadzemnog dijela drveta [35].

Eterično ulje, koje je pod normalnim uslovima tečnog agregatnog stanja, lako se destiliše vodenom parom pa se ova njegova osobina najčešće koristi prilikom izolacije eteričnog ulja iz različitog biljnog materijala.

Eterično ulje drvnog zelenila četinara je bistra, lako pokretna tečnost, svijetlo zelene, odnosno svijetlo žute boje. Neka ulja su bezbojna. Eterična ulja četinara imaju veoma prijatan miris, pa se zbog toga upotrebljavaju za izradu različitih mirisa (parfema), za parfimiranje toaletnih sapuna, za pripremanje mirisnih voda za kupanje i sprejeva za osvježavanje vazduha u prostorijama.

Eterična ulja četinara imaju i ljekovito djelovanje. Tako, eterično ulje jele pojačava sekreciju sluzokože, pa nalazi primjenu u medicini kao esektorans (sredstvo za iskašljavanje).

Eterična ulja smrče, kleke i bijelog bora imaju baktericidno djelovanje, pa se zbog toga upotrebljavaju za inhaliranje kod oboljenja pluća i bronhitisa. Eterično ulje smrče upotrebljava se za liječenje neuralgije i zapaljenja sluzokože. Eterično ulje kleke nalazi primjenu kao lijek kod nekih kožnih oboljenja [15].

Alkoholni ekstrakti eteričnoga ulje ploda kleke upotrebljavaju se i u liječenju gihta, reumatizma, kao i za izradu kozmetičkih preparata za dezinfekciju i deodoraciju [22].

Posljednjih godina, izolati iz različitih biljnih sirovina kao što su **eterična ulja**, aromatizovane vode, hladnopresovana masna ulja i ćelijski sokovi, oleorezini, tinkture, macerati, perkolati, infuzi i pulverizovane biljne sirovine imaju sve veću primjenu u farmaceutskoj industriji za proizvodnju lijekova ("*fitofarmaceuticals*" ili "*fitofarmaka*"), u prehrambenoj industriji, kao nutritivni za poboljšanje nutritivne vrijednosti, senzornih i vizuelnih karakteristika hrane ili istovremeno za povećanje nutritivne i biološke vrijednosti hrane ("*nutriceuticals*") [32].

Potrebno je istaći i to da nakon procesa proizvodnje eteričnog ulja preostali dio sirovine je iskuhano drveno zelenilo četinara koje se može koristiti za spaljivanje u energetske svrhe.

Drvni otpad poslije destilacije se može koristiti i za proizvodnju humusa, postupkom truljenja. Postoji i treća mogućnost korištenja otpada drvnog zelenila četinara poslije destilacije i to za proizvodnju stočnog kvasca pri čemu se od celulozne materije dobija visokovrijedno proteinsko hranivo [35].

Moć biljaka se u najsnažnijoj formi izražava kroz etarska ulja [22].

Materijal i metod rada

Biljni materijal

Kao sirovina za dobijanje eteričnog ulja korišteni su drveno zelenilo i plodovi različitih vrsta četinara. Uzorkovani su na lokalitetu Šumskog Gazdinstva "Banja Luka", JPŠ "Šume Republike Srpske".

Za ispitivanja u ovome radu korištene su sljedeće vrste četinara:

- svježe drveno zelenilo jele (rod: *Abies*);
- drveno zelenilo smrče (rod: *Picea*);
- drveno zelenilo bora (rod: *Pinus*);
- plodovi kleke (rod: *Juniperus*);
- drveno zelenilo duglazije (rod: *Pseudotsuga*).

Prva četiri roda navedenih četinarara rastu u prirodnim staništima na različitim lokalitetima, dok je peti rod uvezen iz Amerike i na našim prostorima se gaji u silvi-kulturi.

Kod roda *Abies* ispitana vrsta je *Abies grandis*, kod roda *Picea* vrsta *Picea abies*, kod roda *Pinus* vrsta *Pinus sylvestrus* (bijeli bor), kod roda *Juniperus* vrsta *Juniperus communis* i kod roda *Pseudotsuga* vrsta *Pseudotsuga menziesii*.

Sirovina za proces hidrodestilacije sadržavala je sve žive sitne grančice sa četinama prečnika do 1 cm na debljem kraju grančice.

Jedna ovakva grančica sastoji se od jednogodišnjih i dvogodišnjih dijelova i novih dijelova koji se razvijaju u toku godine kad je zelenilo uzeto za analizu [15].

Za proces hidrodestilacije eteričnog ulja korištena je poluindustrijska aparatura (hidromodul-četina:voda=1:3). Grančice su mehanički usitnjene radi brže i bolje destilacije eteričnog ulja, a plodovi kleke su propušteni kroz klasičnu drobilicu iz istih razloga.

Nakon procesa hidrodestilacije dobijena eterična ulja su čuvana u tamnim staklenim vakumskim bočicama u rashlađenim uslovima (+7°C) do kraja laboratorijskih ispitivanja (do 5 mjeseci).

Tabela 1: Opis stanišnih uslova i morfometrijskih svojstava sa kojih je uzorkovano drveno zelenilo četinarara korišteno za proizvodnju eteričnog ulja [20]

Vrsta drveća (Narodni naziv)	Jela	Smrča	Bor	Duglazija
Geografska širina	44° 44' 58.7"	44° 23' 12.4"	44° 45' 37.1"	44° 45' 1.8"
Geografska dužina	17° 31' 8.1"	16° 39' 39.5"	17° 30' 21.0"	17° 31' 32.1"
Nadmorska visina /m/	300	300	280-300	300-320
Nagib /°/	2	2	6	6
Ekspozicija	Južna	Jugo-zapad	Sjevero-istok	Istočna
Geološka podloga	Fliš	Kreč.65%, dol.kreč 12%, kreč.dol 12%, dolom 11%	Fliš	Fliš
Tip zemljišta	Pseudoglej na flišu	Serijska krečnjačkih i dolomitnih zemljišta	Pseudoglej na flišu	Pseudoglej na flišu
Pros. starost stabala /god./	32	35	39	37
Pros. visina stabala /m/	20	15	26	28
Pros. prečnik stabala /cm/	30	22	34	35

Metod rada

Hidrodestilacija eteričnog ulja iz drvnog zelenila i plodova četinarara u poluindustrijskim uslovima

Za hidrodestilaciju eteričnog ulja u poluindustrijskim uslovima iz drvnog zelenila i plodova četinarara korišten je pogodni mali destilator koji radi na principu destilacije vodom. Destilator je postavljen na terenu nedaleko od mjesta sječe. Na taj način su bili smanjeni troškovi transporta drvnog zelenila, pa prema tome i troškovi proizvodnje eteričnog ulja.

Za hidrodestilaciju je korišten destilator sa fiksnim kotlom kapaciteta oko 75 kg četina i 125 kg plodova kleke. Fiksirani kotao izrađen je u obliku valjka od aluminijskog lima, kao i poklopac kotla koji se skidao prilikom punjenja i pražnjenja kotla. Veza između kotla i

poklopca realizovana je zaptivanjem koje se postizalo pomoću vode koja se nalazila između zidova kanala i poklopca (vodeni dihtung).

Provodna cijev je izgrađena od istog materijala kao i kotao. Preko dva držača povezuje kotao i hladilo koje ima iste dimenzije kao i kotao u kojem se nalazi aluminijska spirala. Ispuštanje tople vode iz hladila vršilo se preko kratke cijevi, a dovod hladne vode putem druge cijevi.

Posuda za odvajanje izdestilisanog eteričnog ulja i vode (florentinka) napravljena je od stakla čija je zapremina iznosila 2 litre.

Ognjište destilatora izrađeno je od običnog lima i snabdjeveno rešetkom koja je omogućavala normalno sagorijevanje. Kao izvor energije za proces hidrodestilacije je korišten plin.

Temperatura u toku hidrodestilacije se kretala od 93°C-102°C, pritisak je iznosio 0.5 bara, a proces hidrodestilacije je trajao oko 3 sata.

Ispitivanje dobijenog eteričnog ulja

Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika eteričnog ulja

U cilju praćenja mogućih hemijskih promjena, koje mogu nastati u ulju prilikom hidrodestilacije, usljed nepropisnog skladištenja ili starenja, određuju se fizičko-hemijske konstante. Najvažnije fizičke konstante koje se upotrebljavaju prilikom ocjenjivanja nekog eteričnog ulja su gustina i indeks refrakcije, a od hemijskih konstanti peroksidni broj [15].

Korištene su standardne metode: za određivanje gustine metoda za određivanje gustine piknometrom; indeks refrakcije refraktometrom ABBE REFRACTOMETER, LEICA MARK II PLUS. Navedene metode propisane su u Ph. Jug.V (2001).

U procesu ispitivanja antioksidativnih karakteristika dobijen eteričnog ulja određene su vrijednosti peroksinog broja korištenjem standardne jodometrijske Wheeler-ove metode [4], [10].

Određivanje sastava eteričnog ulja gasnom hromatografijom (GC)

Izvršena je standardna GC analiza za 5 uzoraka dobijenih eteričnih ulja četinara, korištenjem inertnog standarda (-)-fenhona (Varian) [12].

Rađeno je pod sljedećim radnim uslovima:

- staklena kapilarna kolona INNOWAX (30m x 0.32mm x 0.5µm);
- temperaturni program 60°C/0.5min.; 4°C/min. 90°C; 8°C/min. 200°C-10min.;
- temperatura injektora 250°C;
- temperatura detektora 280°C;
- split odnos 1:5;
- uzorci su razblaživani u n-heksanu;
- injektirana zapremina 10 µl.

Određivanje sastava eteričnog ulja visokopritisnom tečnom hromatografijom (HPLC)

Izvršena je standardna HPLC analiza [17] 5 uzoraka dobijenih eteričnih ulja četinara na uređaju HPLC Agilent 1100 Series.

Rađeno je pod sljedećim radnim uslovima:

- kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.8x150 mm, 5 µm;
- eluent acetonitril/voda = 85/15;
- detekcija 205 nm;
- protok 1 ml/min;
- temperatura 25°C;
- injektirana zapremina 20 µl.

Koncentracije uzoraka pri injektiranju su prikazane u tabeli 2 pri čemu su uzorci rastvarani u acetonitrilu.

Identifikacija najvećeg broja komponenti vršena je metodom inertnog standarda.

Tabela 2: Koncentracije uzoraka pri injektiranju

Uzorak	Koncentracija (mg/ml)
1.	0.91
2.	0.84
3.	0.96
4.	0.85
5.	1.16

Uzorak 1 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Abies grandis*-jela;
Uzorak 2 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Picea abies*-smreka;
Uzorak 3 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Pinus sylvestris*-bor;
Uzorak 4 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz plodova *Juniperus communis*-kleka;
Uzorak 5 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Pseudotsuga menziesii*-duglazija.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti eteričnog ulja

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti eteričnog ulja upotrebljeni su sljedeći sojevi bakterija: *Salmonella enteritidis* (G-, patogena bakterija), *Staphylococcus aureus* (G +, patogena bakterija), *Escherichia coli* (G - bakterija), *Bacillus cereus* (G +, sporogena) i *Bacillus subtilis* (G +, sporogena). Sve korištene kulture su iz kolekcije laboratorije za mikrobiologiju Veterinarskog instituta dr Vaso Butozan u Banja Luci.

Kao hranljive podloge korišteni su:

- Neutralni agar (Torlak Beograd);
- Krvni agar (Torlak Beograd) i
- Muellerr Hinton agar (Torlak Beograd) – MHA za izvođenje antibiograma.

Korištene su i sljedeće antibiogram tablete na MHA:

- Penicilin;
- Amoksicilin;
- Amikacin i
- Ceftriakson.

Tablete se pripremaju pod aseptičkim uslovima, suvim procesom, što im obezbjeđuje veliku stabilnost i na sobnoj temperaturi i temperaturi termostata. Aktivna supstanca je dobro homogenizovana, pa su tablete ujednačene u jednoj i više šarži, čime se postiže dobra reproduktivnost rezultata [3].

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti dobijenog eteričnog ulja vršeno je na sljedeći način:

Po 1 ml suspenzije, sa brojem ćelija 10^7 i 10^6 ćelija/ml, homogenizovan je sa 9ml otopljene i na 45°C ohlađene neutralne i krvne podloge, koja je razlivena u Petri ploču. Nakon želiranja u podlozi su napravljeni "bunarčići" prečnika 9mm, sterilnom cjevčicom. U "bunarčice" je mikropipetom nanijeto po 10 µl uzoraka eteričnog ulja. Inkubacija je vršena na 37°C. Prvo očitavanje zona inhibicije je obavljeno nakon 24h, a konačni su rezultati očitani nakon 48h. Za svako razrijeđenje svakog uzorka urađena su po tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost prečnika zone inhibicije rasta (u mm).

Ispitivanje osjetljivosti test mikroorganizama na referentne antimikrobne supstance

Ispitivanje osjetljivosti test mikroorganizama na referentne antimikrobne supstance obavljeno je disk-difuzionom metodom [9]. Po 1 ml suspenzije sa brojem ćelija 10^7 i 10^6 ćelija/ml homogenizovano je sa 9ml otopljene i na 45°C ohlađene podloge MHA-a, koja je razlivena u Petri ploču. Nakon želiranja na podlogu su nanijeti antibiogram diskovi, kao i po

10 μ l uzoraka eteričnog ulja. Osim eteričnog ulja na MHA su postavljeni i antibiotici kao referentne antimikrobne supstance. Petri ploče su inkubirane na 37°C. Svako razrijeđenje je urađeno u tri ponavljanja, a rezultati su očitani kao prečnik zone inhibicije rasta i izraženi kao srednja vrijednost u milimetrima.

Rezultati istraživanja i diskusija

Rezultati dobijeni u ovome radu prikazani su u 21. tabeli i na 5 slika (dijagrama) i predstavljeni su srednjim vrijednostima 5 ili 10 paralelnih mjerenja.

1. Gustina i indeks refrakcije eteričnih ulja

U tabeli 3 prikazane su srednje vrijednosti pet paralelnih mjerenja gustine i indeksa refrakcije svakog ispitanog uzorka dobijenog eteričnog ulja.

Tabela 3: Gustina i indeks refrakcije ispitanih eteričnih ulja

Uzorak	Gustina (g/cm ³)	Indeks refrakcije (ⁿ D ²⁰)
1	0.8816	1.4756
2	0.8904	1.4750
3	0.8715	1.4732
4	0.8632	1.4725
5	0.8545	1.4748

U tabeli:

Uzorak 1 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Abies grandis*- jela;
 Uzorak 2 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Picea abies*-smreka;
 Uzorak 3 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Pinus sylvestris*-bor;
 Uzorak 4 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz plodova *Juniperus communis*-kleka;
 Uzorak 5 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Pseudotsuga menziesii*-duglazija.

Gustina je vrlo važan kriterijum za ocjenu kvaliteta, porijekla i čistoće nekog eteričnog ulja. Njena vrijednost govori i o sastavu samog ulja [26].

Indeks refrakcije je takođe jedna od najvažnijih fizičkih konstanti koja se upotrebljava prilikom ocjenjivanja eteričnog ulja.

Vrijednosti ovih konstanti ispitanih eteričnih ulja dobijenih hidrodestilacijom u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora koji se odnose na srodne vrste četinarara [15], [26], [31].

U dostupnoj literaturi nema objavljenih podataka o fizičko-hemijskim konstantama eteričnog ulja jele, smrče, bora, kleke i/ili duglazije sa naših prostora.

Poređenjem dobijenih vrijednosti ovih fizičko-hemijskih konstanti koje se odnose na različite vrste četinarara možemo zaključiti de se ne zapažaju znatne međusobne razlike.

To nam ukazuje na činjenicu da se putem navedenih konstanti ne bi moglo lako utvrditi, na primjer, eventualno falsifikovanje nekih kvalitetnijih (skupljih) ulja (eterično ulje kleke) sa manje kvalitetnim eteričnim uljima četinarara, te da su u tom pravcu neophodne dodatne analize.

2. Vrijednost peroksidnog broja ispitanih uzoraka

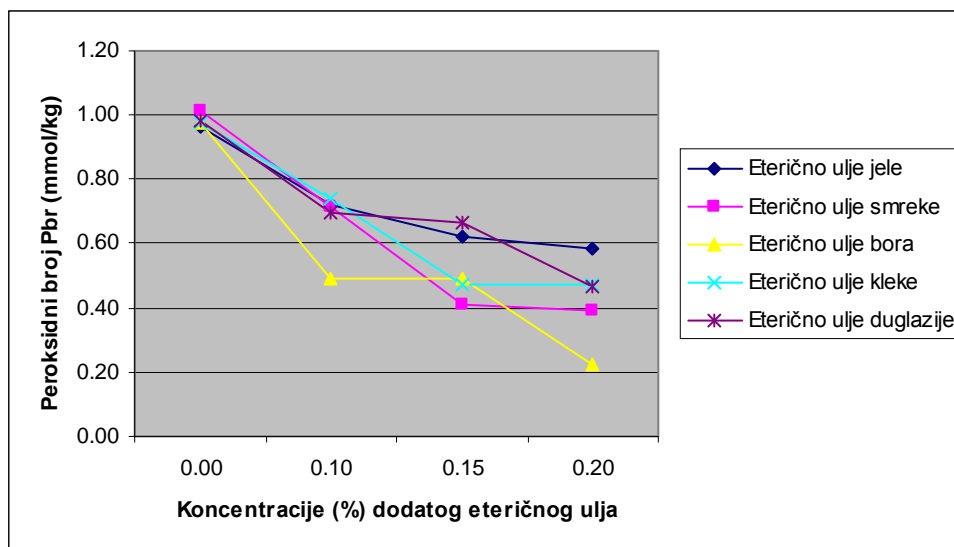
Nezasićene masne kiseline pod uticajem kiseonika iz vazduha, svjetlosti, temperature i teških metala podliježu reakcijama oksidacije. Reakcija je u početku spora (nastali proizvodi

se ne mogu dokazati organoleptički). U drugoj fazi proces oksidacije se ubrzava eksponencijalno (mijenjaju se organoleptička svojstva). Primarni proizvodi procesa oksidacije su hidroperoksidi i peroksidi, a njihovo prisustvo se prvenstveno ispituje određivanjem peroksidnog broja [10].

U cilju ispitivanja djelovanja eteričnog ulja izdvojenog iz drvnog zelenila i plodova četinara i utvrđivanja efikasnosti njegovih eventualnih antioksidativnih karakteristika određene su vrijednosti peroksidnog broja (tabela 4 i slika 1) uzoraka svinjske masti sa različitim koncentracijama dodatih eteričnih ulja (određivanje održivosti masti). Uzorci svinjske masti sa različitim koncentracijama dodatih eteričnih ulja skladišteni su 15 dana u rashlađenim uslovima na temperaturi od +7°C.

Tabela 4: Vrijednosti peroksidnog broja Pbr (mmol/kg) ispitanih uzoraka svinjske masti u koje je dodato eterično ulje u koncentracijama od 0.00%, 0.10%, 0.15% i 0.20%

Uzorak	Peroksidni broj (mmol/kg)			
	0.00%	0.10%	0.15%	0.20%
Eterično ulje drvnog zelenila <i>Abies grandis</i>	0.9659	0.7187	0.6190	0.5838
Eterično ulje drvnog zelenila <i>Picea abies</i>	1.0112	0.7132	0.4095	0.3912
Eterično ulje drvnog zelenila <i>Pinus sylvestris</i>	0.9778	0.4902	0.4897	0.2238
Eterično ulje plodova <i>Juniperus communis</i>	0.9767	0.7382	0.4708	0.4708
Eterično ulje drvnog zelenila <i>Pseudotsuga menziesii</i>	0.9800	0.6990	0.6637	0.4666



Slika 1: Vrijednosti peroksidnog broja Pb (mmol/kg) ispitanih uzoraka svinjske masti u koje je dodato eterično ulje u koncentracijama od 0.00%, 0.10%, 0.15% i 0.20%

Prema Pravilniku o kvalitetu jestivih ulja i masti, peroksidni broj kod jestivih rafiniranih ulja se dozvoljava do 2.5 (mmol/kg), a kod jestivih narafiniranih ulja do 5 (mmol/kg), što je potpuno u skladu sa međunarodnim normama kvaliteta.

Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da dodata eterična ulja u uzorcima znatno usporavaju proces oksidacije i da se mogu koristiti kao prirodni antioksidansi. Sa porastom koncentracije dodatih eteričnih ulja sve više se usporava proces oksidacije (dobijaju se manje vrijednosti peroksidnog broja).

Antioksidativno djelovanje rezultat je prisustva monocikličnih monoterpena (γ -terpinena, limonena), aklohola (citronelol, cineol, borneol, terpineol, linalool) kao i bicikličkih monoterpena (pinen) [24], [12], [18], [1]. Otuda i potiču pozitivni rezultati koji se odnose na djelovanja analiziranih eteričnih ulja kao prirodnih antioksidansa, ali u većim koncentracijama u poređenju sa koncentracijama sintetičkih konzervansa koji se koriste u prehrambenoj industriji. Tako je uočeno značajno antioksidativno djelovanje eteričnog ulja smrče, zatim onog dobijenog iz plodova kleke i drvnog zelenila duglazije i bora, dok je znatno manje djelovanje eteričnog ulja jele kao prirodnog konzervansa, što potvrđuju i kvalitativne karakteristike dobijenog ulja (slika 1).

Prikazani rezultati u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora [13], [30], [12], [14] koji su se bavili sličnim analizama, ali sa eteričnim uljima drugih biljnih sirovina. Tako su i *Chen i sar.* (2006) dokazali snažnu antioksidativnu moć eteričnog ulja *Ruellia tuberosa* koje pripisuju prvenstveno snažnom djelovanju monoterpena prisutnih u eteričnom ulju i naglašavaju značaj njegove primjene u različitim granama industrije.

3. Sastav eteričnog ulja na osnovu analize gasnom hromatografijom (GC)

Sadržaj pojedinih komponenti eteričnog ulja zavisi od perioda uzorkovanja sirovine, klimatskih uslova, lokaliteta, tretmana poslije uzorkovanja (berbe), uslova skladištenja i postupka dobijanja [31]. U tabeli 5 navedene su komponente (frakcije) eteričnih ulja različitog porijekla nakon razdvajanja gasnom hromatografijom.

Prema strukturi hemijski spojevi eteričnih ulja mogu se razvrstati u lančane i ciklične ugljovodonike, alkohole, aldehide, ketone, fenole, estere, etere, a po građi u terpene, terpenoide i fenilpropane. Osnovna građa terpena je ugljovodonik izopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (2-metil-1,4-butadien). Oni mogu biti aciklički ili češće ciklički sa dvije ili više izoprenskih jedinica. Prisutni su kao monoterpeni sa dvije izoprenske jedinice (C 10), seskviterpeni sa tri izoprenske jedinice (C 15), diterpeni - četiri izoprenske jedinice (C 20), triterpeni - šest izoprenskih jedinica (C 30), tetraterpeni – osam izoprenskih jedinica (C 40). Hemijsku strukturu terpena otkrio je Walach davne 1887. godine. Za eterična ulja najznačajniji su monoterpeni, koji grade više od 1500 raznih spojeva, kao i seskviterpeni sa oko 1000 spojeva [12].

Komponente izdvojene gasnom hromatografijom analiziranih uzoraka eteričnih ulja drvnog zelenila i plodova četinara se tako mogu razvrstati u:

- Acikličke monoterpene (p-cimen);
- Acikličke monoterpenske alkohole (linalool, citronelol);
- Monocikličke monoterpene (limonen, terpinen);
- Monocikličke monoterpenske alkohole (terpinen-4-ol);
- Bicikličke monoterpenske alkohole (borneol);
- Aldehide, okside, perokside (citral ili geranial, citronelal, cineol ili askaridol);
- Bicičke monoterpene (pinen, kamfen).

Tabela 5: Kvalitativne karakteristike eteričnih ulja dobijene gasnom hromatografijom

Komponenta	Uzorak (%)				
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5
α-pinen	8.16	11.66	27.26	41.31	14.61
Kamfen	13.12	14.12	3.02	0.33	1.72
β-pinen	42.87	24.13	23.96	2.65	44.45
Limonen	3.89	6.27	2.83	3.69	2.80
γ-terpinen	0.21	0.48	0.35	3.26	4.51
p-cimen	0.03	0.17	0.14	0.39	0.32
L-bornilacetat	8.99	6.61		1.23	0.62
Borneol	0.30	6.55			
Cineol		7.45		0.78	1.99
Citral	0.49	0.52	1.64	1.11	0.65
Citronelol		0.98	4.51	0.69	0.19
Linalool		0.22		0.02	1.11
Citronelal	0.18				
Terpinen-4-ol	0.13		0.71	3.26	2.61
Ukupno	78.38	79.16	64.42	58.72	75.58

U tabeli:

Uzorak 1 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Abies grandis*- jela;

Uzorak 2 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Picea abies*-smreka;

Uzorak 3 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Pinus sylvestris*-bor;

Uzorak 4 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz plodova *Juniperus communis*-kleka;

Uzorak 5 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Pseudotsuga menziesii*-duglazija.

Dobijeni rezultati ukazuju na dosta veliku procentualnu zastupljenost bicikličkih monoterpena. Oni su kod eteričnih ulja dobijenih metodom hidrodestilacije zastupljeni sa oko 70% od ukupno determinisanih frakcija.

Kvalitet eteričnog ulja se najčešće određuje na osnovu sadržaja α -pinena [11]. Prema sadržaju α -pinena u eteričnom ulju dobijenom klasičnom hidrodestilacijom, određenom GC analizom, najkvalitetnije je ulje dobijeno iz plodova kleke (41.31%), zatim ono iz drvnog zelenila bora (27.26%), duglazije (14.61%), smrče (11.66%) i kao posljednje po kvalitetu ulje jele sa najmanjim sadržajem ove frakcije (8.16%).

Tako se na osnovu sadržaja navedene frakcije određene GC analizom može reći da je najkvalitetnije ulje dobijeno iz plodova kleke, dok je najlošijeg kvaliteta ulje dobijeno iz drvnog zelenila jele. Razlika u sadržaju α -pinena je čak 33.15% u eteričnom ulju navedene dvije vrste četinarara. Eterično ulje bora, smrče i duglazije je srednjeg kvaliteta.

4. Sastav eteričnog ulja na osnovu analize visokopritisnom tečnom hromatografijom (HPLC)

Primjenjena metoda gasne hromatografije može se pouzdano koristiti za kvantitativnu i kvalitativnu analizu eteričnog ulja četinarara. Međutim, imajući u vidu da su rezultati pokazali u

prosijeku samo oko 70% od ukupno prisutnih frakcija u ispitanim eteričnim uljima, pristupilo se i HPLC analizi istih uzoraka.

U tabeli 6 prikazane su komponente (frakcije) eteričnih ulja različitog porijekla nakon razdvajanja visokopritisnom tečnom hromatografijom.

Tabela 6: Sastav eteričnog ulja dobijenog primjenom visokopritisne tečne hromatografije

Komponenta	Uzorak (%)				
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5
α - pinen	9.66	14.13	25.93	43.97	12.06
Kamfen	14.8	7.71	2.57	7.71	2.58
β - pinen	46.82	42.58	32.8	2.37	54.4
Limonen	4.01	6.88	2.88	2.66	2.58
γ - terpinen	0.27	0.5	0.13	4.1	4.18
p-cimen	0.27	0.41	1.21	0.3	0.34
L-bornilacetat	8.9	7.72	0.4	1.4	1.37
Cineol	0.21	7.16	0.1	0.02	1.18
Citral	0.51	0.55	1.34	1.75	0.57
Citronelol	0.68	0.67	4.31	0.7	0.55
Linalool	0.4	0.98	0.53	0.29	0.1
Citronelal	1.3	0.1	0.11	0.05	1.13
Terpinen-4-ol	0.71	0.67	0.35	3.83	2.57
Karvon	0.13	0.16	0.34	0.29	0.03
Fenhon	0.53	0.67	0.24	0.84	0.59
Linalil acetat	1.29	0.7	0.39	0.4	1.37
α , β Tujon	0.32	0.98	0.39	0.52	0.43
Mentol	0.04	0.05	0.04	0.02	0.03
Karvakrol	0.05	0.44	0.29	0.05	0.14
Menton	0.41	0.32	0.03	0.75	0.36
Ukupno (%)	91.31	93.38	74.38	72.02	86.56

U tabeli:

Uzorak 1 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Abies grandis*- jela;

Uzorak 2 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Picea abies*-smreka;

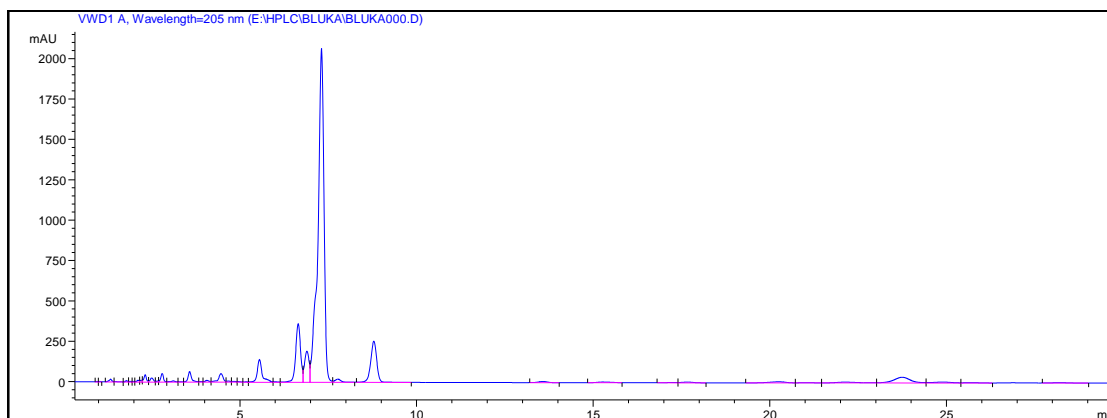
Uzorak 3 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Pinus sylvestris*-bor;

Uzorak 4 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz plodova *Juniperus communis*-kleka;

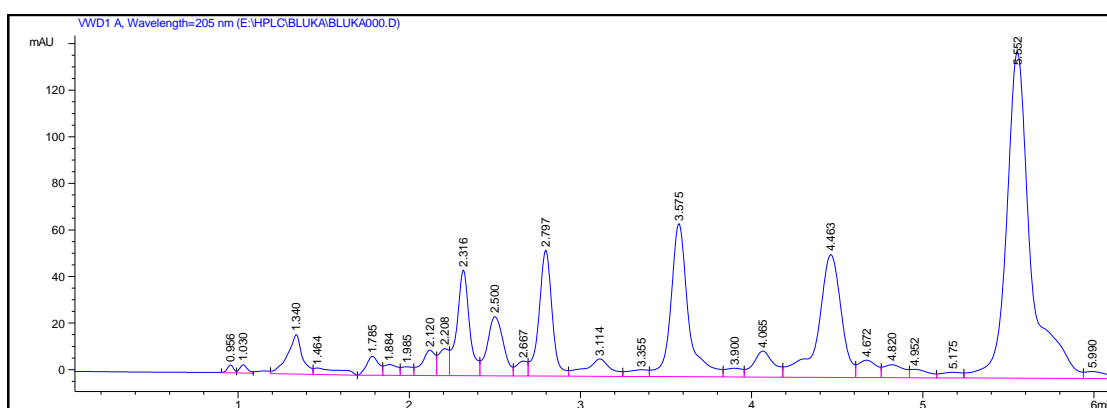
Uzorak 5 - Eterično ulje izdvojeno hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Pseudotsuga menziesii*-duglazija.

Rezultati kvalitativne analize dobijenih eteričnih ulja primjenom visokopritisne tečne hromatografije, prikazani u tabeli 6, mogu se prikazati i putem dijagrama. Kao primjer prikazan je hromatogram eteričnog ulja izdvojenog hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Abies grandis* (slike 2-5).

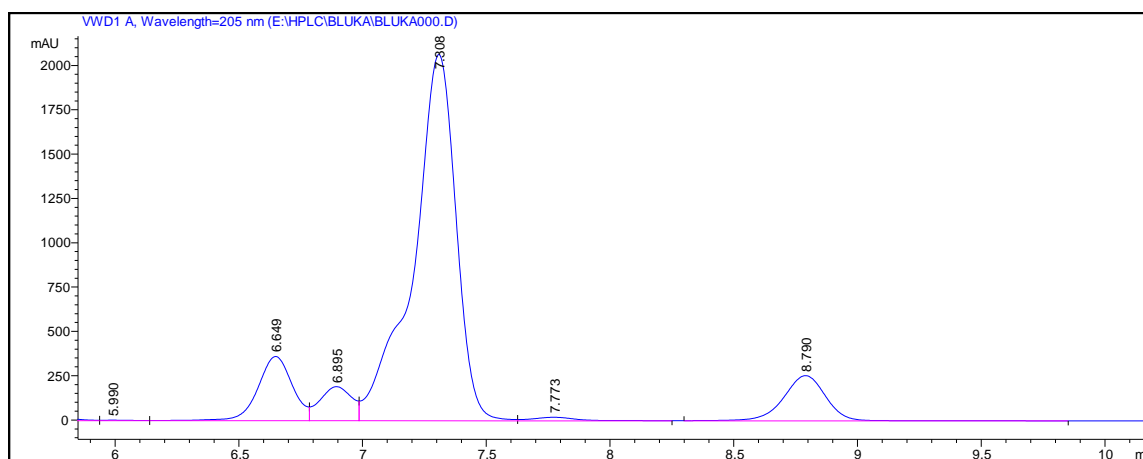
Međutim, prije toga treba istaći da cijeli hromatogram sadrži veliki broj pikova koji determinišu prisustvo odgovarajućih komponenti u injektiranom uzorku. Iz tog razloga je u rezultatima cijeli hromatogram razdvojen na tri segmenta. Prvi segment je onaj do 6 minuta, drugi od 6 do 10 minuta gdje su prisutne dominantne komponente u ispitanom uzorku i treći od 10 do 35 minuta. Prvi i treći segment hromatograma sadrže veliki broj pikova koji ukazuju na malu procentualnu zastupljenost većine komponenti analiziranih eteričnih ulja. Komponente su identifikovane injiciranjem standardnih jedinjenja koja su bila na raspolaganju.



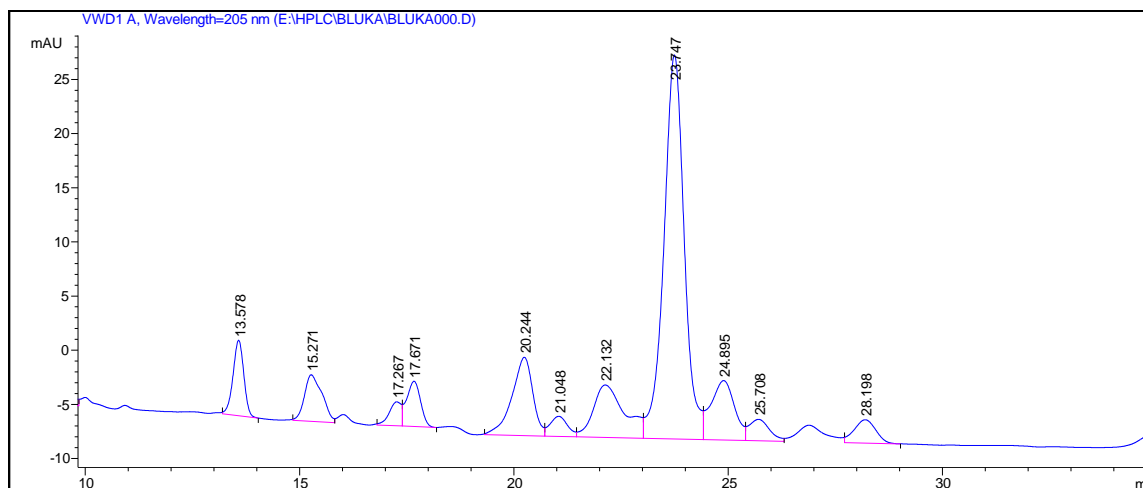
Slika 2: Hromatogram eteričnog ulja izdvojenog hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Abies grandis*



Slika 3: Prvi segment hromatograma eteričnog ulja izdvojenog hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Abies grandis*



Slika 4: Drugi segment hromatograma eteričnog ulja izdvojenog hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Abies grandis*



Slika 5: Treći segment hromatograma eteričnog ulja izdvojenog hidrodestilacijom iz drvnog zelenila *Abies grandis*

Dobijeni rezultati primjenom visokopritisne tečne hromatografije determinišu u prosjeku oko 84% svih prisutnih frakcija (72.02%-93.38%) u uzorcima eteričnih ulja. U nedostatku standarda ostale komponente ispitivanih uzoraka nije bilo moguće identifikovati.

Determinisane frakcije izdvojene visokopritisnom tečnom hromatografijom analiziranih uzoraka eteričnog ulja drvnog zelenila i plodova četinara se tako mogu razvrstati u:

- Acikličke monoterpe (p-cimen);
- Acikličke monoterpenske alkohole (linalool, citronelol);
- Monocikličke monoterpe (limonen, terpinen);
- Monocikličke monoterpenske alkohole (mentol, terpinen-4-ol);
- Fenole&alkohole (karvakrol);
- Ketone (menton, karvon, tujon, fenhon);
- Aldehyde, okside, perokside (citral ili geranial, citronelal, cineol ili askaridol);
- Bicikličke monoterpe (pinen, kamfen).

Prosječni sadržaj acikličkih monoterpena u eteričnim uljima iznosi 0.63% od ukupno determinisanih frakcija, acikličkih monoterpenskih alkohola 1.16%, dok monociklički monoterpeni učestvuju sa 3.55% od ukupno determinisanih frakcija eteričnog ulja.

Kod monocikličkih monoterpenskih alkohola sadržaj terpinen-4-ola iznosi 2.05% , mentola 0.05% (ukupno 2.1%). Karvakrol (fenoli&alkoholi) je u ispitanim eteričnim uljima prisutan sa 0.24%. Ketoni su zastupljeni sa 0.52%, a aldehidi su prisutni u koncentraciji od 1.35%.

Prosječni sadržaj bicikličkih monoterpena u eteričnim uljima iznosi čak 74.94% od ukupno determinisanih frakcija. Posmatrajući sadržaj bicikličkih monoterpena može se reći da su prisutni u velikoj procentualnoj zastupljenosti u poređenju sa ostalim determinisanim frakcijama i da su takvi rezultati u saglasnosti sa rezultatima dobijenim gasnom hromatografijom. Tako je sadržaj α -pinena najveći u eteričnom ulju dobijenom iz plodova kleke, zatim u onom iz drvog zelenila bora, smrče, duglazije, a najmanji u eteričnom ulju jele (za 35% u odnosu na ulje kleke).

Na osnovu sadržaja navedene frakcije može se reći, kao i na osnovu rezultata dobijenih gasnom hromatografijom, da je ulje dobijeno iz plodova kleke najboljeg sastava,

najlošijeg sastava je ulje dobijeno iz drvnog zelenila jele. Eterično ulje bora, smrče i duglazije je sastava srednjeg kvaliteta.

Jedan od najvažnijih članova acikličkih terpena je aldehid **citral** $C_{10}H_{16}O$ [28] čije je prisustvo determinisano u svim analiziranim uzorcima, kako primjenom GC, tako i HPLC metode. Najveći sadržaj ove komponente je ustanovljen u uzorcima eteričnog ulja plodova kleke i drvnog zelenila bora. Značaj prisustva citrala u biljkama (eteričnim uljima), kao i terpena koji nastaju hemijskim reakcijama iz ovog jedinjenja, navode se u radu [6], čak i kao sredstva koje svojim mirisom odbija insekte prenosnike različitih oboljenja (malarija).

Ciklizacijom i dehidratacijom citrala uglavnom nastaje aciklički monoterpen **p-cimen**, čije je prisustvo takođe determinisano. Ispitujući moguće antikancerogeno djelovanje eteričnog ulja *Croton flavens* [34] ističu prisustvo p-cimena u dobijenom ulju koncentracije 0.75%, naglašavajući potrebu determinacije nepoznatih komponenti za potpuno razumijavanje bioaktivnosti izdvojenog ulja.

Citronelal (aldehid) je komponenta ulja koja se od citrala razlikuje samo po tome što mu nedostaje jedna dvostruka veza [28]. Sadržaj ove komponente je zabilježen primjenom visokopritisne tečne hromatografije (najmanji u ulju ploda kleke 0.05%, a najveći u ulju četina jele 1.3%).

Rezultati ukazuju i na znatan sadržaj **cineola** u ulju smrče (6-7% više u odnosu na eterično ulje *Foeniculum vulgare*, [27]), dok se u ulju kleke nalazi u tragovima (0.02%).

U analiziranim uzorcima eteričnog ulja utvrđeno je prisustvo njemu odgovarajućeg acikličkog monoterpenskog alkohola **citronelola** sa znatom zastupljenošću u ulju četina bora i to 4.31%.

Tercijarni alkohol **linalool** nije determinisan u svim uzorcima primjenom GC, dok je primjenom visokopritisne tečne hromatografije njegov sadržaj potvrđen u svim analiziranim uzorcima.

Monoterpenoli su alkoholi koje biljke proizvode hidrolizom monoterpena. Zavisno od građe mogu biti ciklički i aciklički, primarni, sekundarni i tercijarni monoterpenoli – linalool, borneol, tujol, citronelol. Monoterpenoli su slabe kiseline, oksidacijom prelaze u aldehide i ketone kao na primjer borneol u keton borneon ili citronelol u aldehid citronelal. Tercijarni alkoholi ne podliježu oksidoredukcijskim promjenama, međutim vrlo često stvaraju esterske spojeve sa kiselinama (acetati). Tako je linalool vrlo čest sastojak eteričnih ulja, za razliku od mentola koji je znatno zastupljen samo u eteričnom ulju paprene metvice (40-55%) [34].

Navedeno potvrđuju rezultati koji se odnose na sadržaj monocikličnog monoterpenskog alkohola **mentola** u ispitanim uzorcima i koji se kreće u prosjeku 0.06% (sadržaj mentona u uzorcima eteričnih ulja je takođe malih vrijednosti). Takav zaključak potvrđuju i rezultati drugih autora koji se odnose na kvalitativne karakteristike različitih biljnih vrsta. Tako je u eteričnom ulju *Foeniculum vulgare* sadržaj linaloola 1.2%, dok prisustvo mentola nije uopšte zabilježeno [27].

Ispitani sadržaj **terpinen-4-ola** značajan je u ulju kleke i duglazije, dok je u ostalim uljima znatno manjeg, ali zadovoljavajućeg, procentualnog sadržaja. Tako je na primjer u eteričnom ulju *Salvia officinalis* [23] hromatografskim metodama utvrđen sadržaj ove komponente od 0.6%, što je za 3.2% manje u odnosu na njegov sadržaj u ulju kleke i 2% u odnosu na sadržaj u ispitanoj ulju duglazije.

Limonen, monociklički monoterpen, je pored α -pinena najprisutnija komponenta u najrazličitijim biljnim vrstama [34]. Primjenom hromatografskih metoda ustanovljeno je da je ovom frakcijom najbogatije eterično ulje smrče 6.88%, dok je sadržaj u ostalim uljima prilično ujednačen, ali znatno veći u odnosu na sadržaj u eteričnom ulju *Salvia officinalis* 0.7% [23].

Jedan od četrnaest mogućih izomera limonena je **γ -terpinen** [34]. Njegova najveća zastupljenost je u eteričnom ulju kleke i duglezije (iznad 4%). Ona znatno varira od jedne do

druge biljne vrste. Tako je u eteričnom ulju *Thymus spathulifolius* sadržaj γ -terpinena 6.3% [30], u ulju *Satureja subspicata* 9.54% [29], u ulju *Foeniculum vulgare* 2.1%, a u ulju *Salvia officinalis* 0.2% [23].

Karvakrol je monoterpenski fenol, koji u analiziranim eteričnim uljima pokazuje malu procentulanu zastupljenost.

Fenolna molekula je stabilna molekula i ne podliježe postupcima ubrzane razgradnje. Fenoli imaju slabo kisele karakteristike, djelovanje im je agresivno u dodiru sa kožom i sluznicom. Od fenolnih spojeva u biljkama se najčešće nalazi karvakrol [8].

Ketoni, koji nastaju oksidacijom alkohola, konačni su proizvodi biljnog metabolizma. Oni imaju slabe bazne karakteristike, sadrže brojne dvostruke veze, snažni su oksidansi. Takva njihova karakteristika se posebno koristi u aromaterapiji, ali znaju biti i štetni. Tujon tako izaziva epileptične napade pa ga EU propisi dozvoljavaju u hrani samo u količini od 25mg/kg [34].

Primjenom visokopritisne tečne hromatografije utvrđeno je prisustvo **tujona** kao frakcije u uzorcima eteričnih ulja. Od ketona zabilježeno je i prisustvo frakcija **karvona, fenhona i mentona**. Ukupan prosječan sadržaj identifikovanih ketona u uzorcima eteričnih ulja dobijenih standardnom metodom hidrodestilacije iznosi 0.42%.

Rezultati koji se odnose na sastav eteričnog ulja, a koji su dobijeni gasnom hromatografijom potvrđuju prisustvo četrnaest frakcija u deset uzoraka eteričnih ulja, od čega je samo pet komponenti determinisano u svim uzorcima. Rezultati dobijeni visokopritisnom tečnom hromatografijom potvrđuju prisustvo dvadeset frakcija analizom dostupnih standarda u svim ispitanim eteričnim uljima. Znatno veći broj frakcija određenih HPLC metodom može se objasniti većom osjetljivošću i selektivnošću upotrijebljene kolone za ovu vrstu uzoraka kao i većom injektiranom zapreminom analiziranih eteričnih ulja (veći sadržaj komponenti u probi).

Odnos procentualnih zastupljenosti frakcija determinisanih i jednom i drugom hromatografskom metodom nalaze se u međusobnoj saglasnosti. Tako se može zaključiti da su obje primjenjene metode pouzdane i da se mogu koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu eteričnih ulja, te da jedna dopunjava drugu.

5. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja

Sa ciljem utvrđivanja antimikrobne aktivnosti eteričnog ulja drvnog zelenila i plodova četinara urađeni su antibiogram testovi na određene sojeve bakterija sa dobijenim eteričnim uljima i referentnim antimikrobnim supstancama.

U tabelama 7-21 prikazani su rezultati koji se odnose na antimikrobno djelovanje svakog pojedinačnog eteričnog ulja na različitim hranljivim podlogama, dok su u tabeli 22 prikazani rezultati djelovanja antibiotika (penicilina, ceftriaksona, amoksicilina i amikacina) na sojeve bakterija koji su kao test mikroorganizmi upotrebljeni u ispitivanju antimikrobne aktivnosti eteričnog ulja drvnog zelenila četinara.

Ispitani bakterijski sojevi su u različitoj mjeri ispoljili osjetljivost na upotrebljena eterična ulja i na antibiotike.

Tabela 7: Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja *Abies grandis*- jela (razrjeđenje 10^7) na neutralnom agaru (Torlak) (izraženo kao $x_{sr} \pm sd$)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	25.00±0.11	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	26.24±0.11	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	21.34±1.11
<i>Staphylococcus aureus</i>	23.00±0.00	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	15.00±0.00	-

A-antimikrobno djelovanje, Ø-nema djelovanja, +/- -granična antimikrobna aktivnost

Tabela 8: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Abies grandis* (10^7) na krvnom agaru (Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	22.00±0.00	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	17.00±0.00
<i>Escherichia coli</i>	-	12.08±0.80	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	30.00±0.10	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	21.00±0.00

Tabela 9: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Abies grandis* (10^7) na MHA (Mueller-Hinton agar Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	20.10±0.77
<i>Bacillus cereus</i>	-	13.00±0.00	-
<i>Escherichia coli</i>	25.50±0.00	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	20.00±0.00
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	18.00±0.10	-

Iz prethodnih tabela može se vidjeti na osnovu zona inhibicije da eterično ulje *Abies grandis* pokazuje antimikrobno djelovanje na *Bacillus subtilis* na neutralnom i krvnom agaru, dok na MHA pokazuje graničnu antimikrobnu aktivnost. Na *Bacillus cereus* dokazano je antimikrobno djelovanje navedenog eteričnog ulja na neutralnom agaru, na krvnom agaru granična antimikrobna aktivnost, dok na MHA nema djelovanja. Kod ispitivanja antimikrobnog djelovanja ulja na *Escherichia coli* na neutralnom agaru zabilježena je granična antimikrobna aktivnost, na krvnom nema djelovanja, dok je na MHA zabilježeno antimikrobno djelovanje. Na neutralnom agaru dokazana je antimikrobna aktivnost na *Staphylococcus aureus* kao i na krvnom agaru, dok je na MHA granična antimikrobna aktivnost eteričnog ulja *Abies grandis* na ovaj soj ispitanih bakterija. Na neutralnom agaru i MHA nema djelovanja na *Salmonella enteritidis*, dok je na krvnom agaru zabilježena granična antimikrobna aktivnost.

Tabela 10: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Picea abies*-smrča (10^7) na neutralnom agaru (Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	26.00±0.00	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	25.10±0.20	-	-
<i>Escherichia coli</i>	25.00±0.00	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.00±0.00	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	20.00±0.00

Tabela 11: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Picea abies* (10^7) na krvnom agaru (Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	30.00±0.61	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	25.00±0.00	-	-
<i>Escherichia coli</i>	23.00±0.11	-	20.00±0.11
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	20.10±0.00
<i>Salmonella enteritidis</i>	25.00±0.00	-	-

Tabela 12: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Picea abies* (10^7) na MHA (Mueller-Hinton agar Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	20.00±0.00
<i>Bacillus cereus</i>	22.34±1.35	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	20.52±0.20
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.50±0.00	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	13.56±33	-

Iz tabela 10-12 vidljivo je da eterično ulje *Picea abies* pokazuje antimikrobno djelovanje na *Bacillus subtilis* na neutralnom i krvnom agaru, dok na MHA pokazuje graničnu antimikrobnu aktivnost. Na *Bacillus cereus* dokazano je antimikrobno djelovanje navedenog eteričnog ulja na neutralnom agaru, krvnom agaru, kao i na MHA. Kod ispitivanja antimikrobnog djelovanja ulja na *Escherichia coli* na neutralnom i krvnom agaru zabilježeno je antimikrobno djelovanje, dok je na MHA zabilježeno granično antimikrobno djelovanje. Na neutralnom agaru i MHA dokazana je antimikrobna aktivnost na *Staphylococcus aureus*, dok je na krvnom agaru granična antimikrobna aktivnost navedenog eteričnog ulja. Na MHA nema djelovanja na *Salmonella enteritidis*, na neutralnom agaru je zabilježena granična antimikrobna aktivnost, dok je na krvnom agaru dokazano antimikrobno djelovanje.

Tabela 13: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Pinus sylvestris*-bor (10^7) na neutralnom agaru (Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	25.00±0.00	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	20.00±0.20
<i>Escherichia coli</i>	-	-	21.00±0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.00±0.10	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	20.00±0.33

Tabela 14: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Pinus sylvestris* (10^7) na krvnom agaru (Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	25.00±0.09	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	20.00±0.26
<i>Escherichia coli</i>	-	-	21.00±0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	27.00±0.00	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	20.00±0.30

Tabela 15: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Pinus sylvestris* (10^7) na MHA (Mueller-Hinton agar Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	22.00±0.60	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	20.00±0.66
<i>Escherichia coli</i>	22.00±0.90	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	20.60±1.10
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	16.00±0.00	-

Eterično ulje *Pinus sylvestris* pokazuje antimikrobno djelovanje na *Bacillus subtilis* na sve tri podloge. Na *Bacillus cereus* dokazano je granično antimikrobno djelovanje navedenog eteričnog ulja takođe na sve tri korištene podloge. Kod ispitivanja antimikrobnog djelovanja ulja na *Escherichia coli* na neutralnom i krvnom agaru zabilježeno je granično antimikrobno djelovanje, dok je na MHA zabilježeno antimikrobno djelovanje. Na neutralnom i krvnom agaru dokazana je antimikrobna aktivnost na *Staphylococcus aureus*, dok je na MHA granična antimikrobna aktivnost navedenog eteričnog ulja. Na MHA nema djelovanja na *Salmonella enteritidis*, dok je na neutralnom i krvnom agaru dokazano granično antimikrobno djelovanje.

Tabela 16: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Juniperus communis*-kleka (10^7) na neutralnom agaru (Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	25.11±0.11	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	25.00±0.00	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	17.00±1.10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	20.00±0.50
<i>Salmonella enteritidis</i>	25.00±0.00	-	-

Tabela 17: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Juniperus communis* (10^7) na krvnom agaru (Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	30.00±0.00	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	23.00±0.10	-	-
<i>Escherichia coli</i>	24.00±0.14	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	22.00±0.00
<i>Salmonella enteritidis</i>	22.00±0.26	-	-

Tabela 18: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Juniperus communis* (10^7) na MHA (Mueller-Hinton agar Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	21.00±0.00
<i>Bacillus cereus</i>	25.00±0.00	-	-
<i>Escherichia coli</i>	23.00±0.00	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	30.00±0.15
<i>Salmonella enteritidis</i>	25.00±0.40	-	-

Iz tabela 16-18 se vidi da eterično ulje plodova *Juniperus communis* pokazuje antimikrobno djelovanje na *Bacillus subtilis* na neutralnom i krvnom agaru, dok na MHA pokazuje graničnu antimikrobnu aktivnost. Na *Bacillus cereus* dokazano je antimikrobno djelovanje navedenog eteričnog ulja na neutralnom agaru, krvnom agaru, kao i na MHA. Kod ispitivanja antimikrobnog djelovanja ulja na *Escherichia coli* na neutralnom agaru nije zabilježeno antimikrobno djelovanje, dok je na krvnom agaru i MHA dokazano antimikrobno djelovanje. Na *Staphylococcus aureus* na sva tri agara zabilježena je granična antimikrobna aktivnost navedenog ulja. Antimikrobno djelovanje eteričnog ulja *Juniperus communis* na *Salmonella enteritidis* dokazano je na sve tri podloge.

Tabela 19: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Pseudotsuga menziesii*-duglazija (10^7) na neutralnom agaru (Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	22.00±0.41	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	22.86±0.80	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	21.00±0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.00±0.90	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	17.00±0.50	-

Tabela 20: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Pseudotsuga menziesii* (10^7) na krvnom agaru (Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	23.10±0.00	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	14.00±0.23	-
<i>Escherichia coli</i>	-	17.33±0.20	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.00±0.21	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	22.00±0.10	-	-

Tabela 21: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Pseudotsuga menziesii* (10^7) na MHA (Mueller-Hinton agar Torlak)

Indikatorski soj Mikroorganizam	Širina zone inhibicije (mm)		
	A	Ø	+/-
<i>Bacillus subtilis</i>	23.00±0.00	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	25.20±0.12	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	21.00±0.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	22.90±0.80	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	17.00±0.00	-

Iz tabela može se vidjeti da eterično ulje *Pseudotsuga menziesii* pokazuje antimikrobno djelovanje na *Bacillus subtilis* na neutralnom, krvnom agaru, kao i na MHA. Na *Bacillus cereus* dokazano je antimikrobno djelovanje navedenog eteričnog ulja na neutralnom agaru i na MHA, dok na krvnom agaru nema djelovanja. Kod ispitivanja antimikrobnog djelovanja ulja na *Escherichia coli* na neutralnom agaru i na MHA zabilježena je granična antimikrobna aktivnost, dok na krvnom agaru nije zabilježeno antimikrobno djelovanje. Na neutralnom agaru, krvnom agaru i MHA dokazana je antimikrobna aktivnost na *Staphylococcus aureus*. Na neutralnom agaru i MHA nema djelovanja na *Salmonella enteritidis*, dok je na krvnom agaru zabilježena antimikrobna aktivnost.

Antimikrobno djelovanje različitih eteričnih ulja rezultat je prisustva monoterpena u njihovom sastavu [2]. Otuda i snažno antimikrobno djelovanje ispitanih eteričnih ulja drvnog zelenila i plodova četinarara.

Rezultati su pokazali najbolje antimikrobno djelovanje uzoraka eteričnog ulja *Picea abies*, zatim eteričnog ulja *Juniperus communis* i slično antimikrobno djelovanje eteričnog ulja *Pseudotsuga menziesii*, *Abies grandis* i *Pinus sylvestris*.

Eterično ulje *Abies grandis* pokazuje antibakterijsko djelovanje na *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*, dok je na ostale ispitane sojeve slabije odreagovalo.

Eterično ulje *Picea abies* ima najbolje antibakterijske karakteristike. Djeluje na *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, a kod soja *Salmonella enteritidis* pokazuje graničnu antimikrobnu aktivnost.

Eterično ulje *Pinus sylvestris* pokazuje antibakterijsko djelovanje na *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*, dok je kod ostalih ispitanih bakterijskih sojeva slabije odreagovalo. Eterično ulje plodova *Juniperus communis* ima dobro antimikrobno djelovanje i to na *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* i *Salmonella enteritidis*, a kod ostalih je utvrđena granična antimikrobna aktivnost osim *Escherichia coli* na neutralnom agaru koja je rezistentna. Eterično ulje *Pseudotsuga menziesii* sličnih je antimikrobnih karakteristika kao i ulje jele. Ono takođe pokazuje antibakterijsko djelovanje na *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*, dok je na ostale ispitane sojeve slabije odreagovalo.

Rezultati su pokazali najbolje i antimikrobne i antioksidativne karakteristike eteričnog ulja *Picea abies* i odmah iza njega eteričnog ulja *Juniperus communis*.

Posmatrajući analizirane bakterijske sojeve iz rezultata se jasno vidi da je najveću osjetljivost na eterična ulja svih pet vrsta četinarara pokazala sporogena bakterija *Bacillus subtilis*. Odmah iza nje nalaze se sporogena bakterija *Bacillus cereus* i patogena bakterija *Staphylococcus aureus* koje su pokazale neotpornost na eterična ulja četiri vrste četinarara. Bakterije *Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis* su gotovo rezistentne i pokazuju osjetljivost na samo jedno eterično ulje i to *Escherichia coli* na eterično ulje drvnog zelenila *Picea abies*, a *Salmonella enteritidis* na eterično ulje plodova *Juniperus communis*.

Ukoliko se generalno posmatraju svi ispitani bakterijski sojevi može se istaći da su se u toku mikrobioloških analiza najbolji rezultati dobili na neutralnoj podlozi (neutralni agar), što se tiče širina zona inhibicije kao i uočavanja samih izrasta. Odmah iza neutralnog agara je Mueller-Hinton agar koji se obično koristi za ispitivanje djelovanja različitih antibiotika na različite sojeve bakterija.

Tabela 22: Djelovanje antibiotika na MHA (Mueller-Hinton agar Torlak) (izraženo kao $x_{sr} \pm sd$)

Mikroorganizam	P	CRO	AX	AK
<i>Bacillus subtilis</i>	28.00±0.10	20.00±0.00	32.00±0.15	37.20±0.22
<i>Bacillus cereus</i>	18.10±0.00	25.53±0.11	26.10±0.00	26.00±0.00
<i>Escherichia coli</i>	14.00±0.31	29.00±0.00	26.00±0.50	25.50±0.33
<i>Staphylococcus aureus</i>	30.67±1.03	29.08±0.20	29.89±0.15	27.40±0.33
<i>Salmonella enteritidis</i>	11.00±0.20	37.00±0.00	38.00±0.00	38.00±0.00

P-penicilin, CRO-ceftriakson, AX-amoksicilin, AK-amikacin

Iz tabele 22, na osnovu literaturnih podataka [33], vidljivo je da je *Bacillus subtilis* osjetljiv na djelovanje antibiotika penicilina (≥ 26), cefriaksona (≥ 16), amoksicilina (≥ 28), kao i amikacina (≥ 19) zasijan na MHA. Na istoj podlozi *Bacillus cereus* je otporan na djelovanje penicilina, osjetljiv na djelovanje cefriaksona, umjereno osjetljiv na djelovanje amoksicilina i osjetljiv na djelovanje amikacina. *Escherichia coli* pokazuje otpornost na antibiotik penicilin, osjetljivost na antibiotik cefriakson, umjerenu osjetljivost na amoksicilin i osjetljivost na amikacin. Patogena bakterija *Staphylococcus aureus* osjetljiva je na djelovanje penicilina, cefriaksona, amoksicilina kao i amikacina. *Salmonella enteritidis* otporna je na djelovanje penicilina, dok je osjetljiva na djelovanje ostala tri antibiotika.

Najveću osjetljivost pokazale su G + bakterija *Bacillus subtilis* i G + bakterija *Staphylococcus aureus*, koje se na osnovu zona inhibicije oko diska mogu definisati kao potpuno osjetljivi sojevi na sve upotrijebljene antibiotike.

Poredeći antimikrobno djelovanje eteričnih ulja četinarara i antibiotika iz rezultata je vidljivo da je najjače djelovanje i jednih i drugih referentnih antimikrobnih supstanci na bakterije *Bacillus subtilis*, a zatim na *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*. Utvrđeno je da najbolje antimikrobne karakteristike pokazuje eterično ulje *Picea abies* pa je iz tog razloga u

tabeli broj 23 kao primjer prikazano uporedno antimikrobno djelovanje navedenog ulja i referentnog antibiotika penicilina. Vidljivo je da je *Bacillus subtilis* osjetljiv na djelovanje antibiotika penicilina (≥ 26) [33], ali i eteričnog ulja *Picea abies*.

Tabela 23: Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Picea abies* i antibiotika penicilina

Mikroorganizam	Eterično ulje	Antibiotik
	Zona inhibicije (mm) -sa 10 μ l eteričnog ulja-	Zona inhibicije (mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	26.00	28.00
<i>Bacillus cereus</i>	25.10	18.10
<i>Escherichia coli</i>	25.00	14.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.00	30.67
<i>Salmonella enteritidis</i>	20.00	11.00

U dostupnoj literaturi nema podataka o djelovanju eteričnog ulja drvnog zelenila i plodova četinarara na rast i razmnožavanje mikroorganizama. Međutim, iz dobijenih rezultata može se vidjeti da ova ulja posjeduju snažnu antimikrobnu aktivnost.

Iz nekih literaturnih podataka saznajemo da gram-pozitivne bakterije pokazuju mnogo veću osjetljivost na djelovanje eteričnih ulja od gram-negativnih bakterija [17]. Međutim, prikazani rezultati ne pokazuju selektivnost djelovanja ispitanih ulja na navedene sojeve bakterija. Rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja antimikrobne aktivnosti eteričnog ulja biljke *Thymus spathulifolius* [30], *Vitis Vinifera* L. [5], *Satureja subspicata* [29].

Poznato je da su monoterpeni, monoterpenski aldehidi eteričnih ulja različitih biljnih vrsta dominantnog antivirusnog, antibakterijskog, kao i sedativnog djelovanja. Monocikličnim monoterpenima (limonen), monocikličnim monoterpenskim alkoholima (terpinen-4-ol) kao i acikličkim monoterpenskim alkoholima eteričnih ulja (linalool, citronelol) su također dokazane iste ili slične karakteristike [30]. Neki autori posebno naglašavaju značaj prisustva bicikličkih monoterpena (α -pinen) čiji sadržaj čak i kod istih biljnih vrsta bitno varira u zavisnosti od geografskog porijekla sirovine [29], [25].

Sve navedene frakcije determinisane se u upotrebljenim eteričnim uljima kao referentnim supstancama sa ciljem utvrđivanja osjetljivosti navedenih sojeva bakterija.

Na osnovu toga može se reći da su rezultati mikrobioloških analiza potvrđeni i hemijskim rezultatima dobijenim hromatografskim metodama analize.

Zaključak

Na osnovu rezultata ispitivanja u ovom radu mogu se izvesti sljedeći bitni zaključci:

1. *Hemijske karakteristike eteričnog ulja dobijenog iz drvnog zelenila i plodova četinarara u poluindustrijskim uslovima*
 - Na osnovu kvalitativnih karakteristika analiziranih uzoraka eteričnih ulja određenih pomoću gasne hromatografije i visokopritisne tečne hromatografije, može se zaključiti da eterično ulje ispitanih četinarara sadrži sljedeće frakcije:
 - Aciklične monoterpene (p-cimen);
 - Aciklične monoterpenske alkohole (linalool, citronelol);
 - Monocikličke monoterpene (limonen, terpinen);
 - Monocikličke monoterpenske alkohole (mentol, terpinen-4-ol);
 - Fenole&alkohole (karvakrol);
 - Ketone (menton, karvon, tujon, fenhon);
 - Aldehide, okside, perokside (cital ili geranial, citronelal, cineol ili askaridol);

- Bicikličke monoterpeni (pinen, kamfen).
 - Posmatrajući prosječan sadržaj bicikličkih monoterpena može se zaključiti da su prisutni u velikoj procentualnoj zastupljenosti u poređenju sa ostalim determinisanim frakcijama (čak 74.94%)
 - Rezultati dobijeni GC i HPLC analizom nalaze se u međusobnoj saglasnosti.
 - Na osnovu sadržaja navedenih frakcija može se zaključiti da je:
 - najboljeg sastava eterično ulje dobijeno iz plodova *Juniperus communis*,
 - najlošijeg sastava eterično ulje dobijeno iz drvnog zelenila *Abies grandis* i
 - eterično ulje *Pinus sylvestris*, *Picea abies* i *Pseudotsuga menziesii* sastava srednjeg kvaliteta.
2. *Antioksidativno djelovanje ispitanih uzoraka eteričnog ulja*
- Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da dodata eterična ulja u uzorcima znatno usporavaju proces oksidacije i da se mogu koristiti kao prirodni antioksidansi.
 - Determinisano se značajno prisustvo komponenti (monocikličkih monoterpena, alkohola, bicikličkih monoterpena) priznatog antioksidativnog djelovanja u ispitanim eteričnim uljima.
 - Uočeno je značajno antioksidativno djelovanje eteričnog ulja *Picea abies*, zatim eteričnog ulja dobijenog iz plodova *Juniperus communis* i drvnog zelenila *Pseudotsuga menziesii* i *Pinus sylvestris*.
 - Znatno je manje djelovanje eteričnog ulja *Abies grandis* kao prirodnog konzervansa što potvrđuju i kvalitativne karakteristike dobijenog ulja.
3. *Antimikrobno djelovanje dobijenih eteričnih ulja*
- Na osnovu rezultata dobijenih mikrobiološkim analizama može se zaključiti da dobijena eterična ulja posjeduju snažnu antimikrobnu aktivnost.
 - Rezultati su pokazali najbolje antimikrobno djelovanje eteričnog ulja *Picea abies*, zatim eteričnog ulja *Juniperus communis* i slično antimikrobno djelovanje eteričnog ulja *Pseudotsuga menziesii*, *Abies grandis* i *Pinus sylvestris*.
 - Posmatrajući analizirane bakterijske sojeve može se zaključiti da je najveću osjetljivost na eterična ulja svih pet vrsta četinara pokazala sporogena bakterija *Bacillus subtilis*.
 - Na osnovu rezultata koji se odnose na antimikrobno djelovanje upotrijebljenih antibiotika kao referentnih antimikrobnih supstanci može se zaključiti da su najveću osjetljivost pokazale G + bakterija *Bacillus subtilis* (sporogena) i G + bakterija *Staphylococcus aureus* (patogena bakterija), koje se na osnovu zona inhibicije oko diska mogu definisati kao potpuno osjetljivi sojevi na sve upotrijebljene antibiotike. Najjače djelovanje eteričnih ulja ustanovljeno je na bakterije *Bacillus subtilis*, a zatim na *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*.
 - Rezultati mikrobioloških analiza su potvrđeni i hemijskim rezultatima dobijenim hromatografskim metodama analize.
- Na kraju, sva izolovana eterična ulja **posjeduju snažnu antimikrobnu i antioksidativnu građu i aktivnost** i mogu se koristiti kao prirodni konzervansi.

Literatura

- Amin I., Norazaidah Y., Hainida K. I. E. (2006.) Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus species*, Food Chemistry, 94, 47-52
- Aničić V. Nada, Dimitrijević Suzana, Ristić S. M., Petrović S. S., Petrović D. S. (2005.) Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Melissa officinalis* L., *Lamiaceae*, 59 (9-10), 243-247
- Antibiogram tablete (2000.) Institut za imunologiju i virusologiju, Torlak, Beograd
- AOAC. (1990.) Official methods of analysis of the association chemists 15th edition, Washington, DC, USA
- Baydar N. G., Ozkan G., Sagdic O. (2004.) Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts, Food Control, 15, 335-339
- Burfield T., Reekie S. L. (2005.) Mosquitoes, malaria and essential oils, The International Journal of Aromatherapy, 15, 30-41
- Chen F. A., Wu A. B., Shieh P., Kuo D. H., Hsieh C. Y. (2006.) Evaluation of the antioxidant activity of *Ruellia tuberosa*, Food Chemistry, 94, 14-18
- Cieslik Ewa, Greda Anna, Adamus W. (2006.) Contents of polyphenols in fruit and vegetables, Food Chemistry, 94, 135-142
- Cvetković D., Markov S., Velićanski Aleksandra (2005.) Antimikrobna aktivnost kombuhe od rtanjskog čaja, Hemijska industrija, Beograd, 9-10, 248-253
- Dimić Etelka, Turkulov J. (2000.) Kontrola kvaliteta u tehnologiji jestivih ulja, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad
- Đorđević Dragana, Branković V. (2005.) Određivanje sadržaja komponenti u etarskom ulju kleke gasnom hromatografijom, Farmaceutsko-hemijska industrija "Zdravlje-Pharmaco", Leskovac
- Eminagaoglu O., Tepe B., Yumrutas O., Akpulat A. H., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A. (2006.) The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten, Food Chemistry
- Gurdip S., Sumitra Maurya, Lampasona M. P., Catalan C. (2005.) Chemical constituents antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract, Food Control
- Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandl S., Bauer F. (2006.) The antioxidative properties of *Holy basil* and *Galangal* in cooked ground pork, Meat Science, 72, 446-456
- Kapetanović S. (1988.) Eterično ulje od drvnog zelenila četinarara-dobijanje i fizikalno hemijske konstante, Šumarstvo i prerada drveta, Sarajevo, 7-9, 75-84
- Karaman I., Sahin F., Gulluce M., Ogutcu H., Sengul M, Adiguzel A. (2003.) Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *J. oxycedrus* L., Journal of Ethnopharmacology, 85, 231-235
- Kumaran A., Karunakaran R. J. (2005.) Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*, Food Chemistry
- Magwa M. L., Gundidza M., Gweru N., Humphrey G. (2006.) Chemical composition and biological activities of essential oil from the leave of *Sesuvium portulacastrum*, Journal of Ethnopharmacology, 103, 85-89
- Marjanović-Balaban Željka, Miletić P. (2005.) Uticaj mikrotalasa na brzinu destilacije i prinos eteričnog ulja iz drvnog zelenila četinarara, Hemijska industrija, 9-10, 259-262, Beograd
- Mataruga M., Isajev V., Lazarev V., Balotić P., Daničić Vanja (2005.) Registar šumskih sjemenskih objekata RS-Osnovna unapređenja sjemenske proizvodnje, Šumarski fakultet Univerziteta u Banja Luci, Banja Luka

- Miletić P., Marjanović-Balaban Željka, Rodoljub O., Grujić R. (2004.) Četinari kao potencijalna sirovina za proizvodnju eteričnih ulja, Glasnik Šumarskog fakulteta Univerziteta u Banja Luci, Banja Luka, 1, 97-109
- Milić Matović M. (2003.) Lekovita moć bilja, Beograd
- Nickavar B., Mojalo F., Asgarpanah J. (2005.) Volatile composition of the essential oil of *Salvia hypolenca* Benth., The International Journal of Aromatherapy, 15, 51-53
- Ruberto G., Baratta M. T. (2000.) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems, Food Chemistry, 69, 167-174
- Sefidkon F., Jamzad Z., Mirza M. (2004.) Chemical variation in the essential oil of *Satureja sahendica* from Iran, Food Chemistry, 88, 325-328
- Senić R., Filipović D. (1982.) Određivanje viskoziteta i njegove temperaturne zavisnosti za etarska ulja dobijena iz četinara crnog bora, krivulja i kleke, Glasnik Šumarskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu, 26, 231-234
- Singh G., Maurya S., Lampasona M. P. Catalan C. (2005.) Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract, Food Control
- Sioumis N., Kallithraka Stamatina, Makris D. P., Kefalas P. (2006.) Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity, Food Chemistry, 94, 98-104
- Skočibušić Mirjana, Bezić Nada, Dunkić Valerija (2006.) Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. Grooving in Croatia, Food chemistry, 96, 20-28
- Sokmen A., Gulluce Medine, Akpulat H. A., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M., Sahin F. (2004.) The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*, Food Control, 15, 627-634
- Stanković M. (1999.) Ekstrakcija bioaktivnih proizvoda iz biljnih sirovina, Glasnik hemičara i tehnologa Republike Srpske, 41, 27-33
- Stanković Z. M., Nikolić D. Vesna (2002.) Beli luk (*Allium Sativum L.*): Bioaktivni sastojci i izolati, Monografija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, Leskovac
- Suvajdžić Lj. (2004.) Priručnik iz mikrobiologije sa vježbama za studente farmacije, Ortomedics, Novi Sad
- Sylvestre M., Pichette A., Longtin A., Nagau F., Legault J. (2006.) Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe, Journal of Ethnopharmacology, 103, 99-102
- Šikanjić S., Miletić P., Oljača R., Marjanović-Balaban Željka, Tešić M. (2005.) Prilog proučavanju ekstrakcije eteričnog ulja iz drvnog zelenila četinara, Glasnik Šumarskog fakulteta Univerziteta u Banja Luci, Banja Luka, 4, 55-63

DETERMINING THE CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF CONIFERS AND EXAMINE THE POSSIBILITIES OF THEIR APPLICATION IN INDUSTRY

Željka Marjanović-Balaban, P. Miletić

Abstract

There is a great potential of wood verdure as possible raw material for production of conifers essential oils in Republika Srpska. Therefore, goal and tasks of the analysis are oriented toward defining the chemical features, antioxidant and antimicrobial parameters of analyzed conifers essential oils (fir, spruce, pine, juniper, douglas fir). Oil content of individual components (chemical composition) was determined using GC and HPLC. Values of the peroxide number were also determined in order to monitor antioxidant activity of essential oil of various species of conifers. Antimicrobial activities of respective essential oils were analyzed on *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*. Antimicrobial activity of essential oils was compared with referent antibiotics in order to determine possibility of using these essential oils in pharmaceutical industry and food industry as "natural preserving agents".

Key words: essential oil, conifers, chemical features, antioxidant activity, antimicrobial activity, industrial usage