

Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja i hidrolata izabраниh vrsta biljaka

Miletić, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:028626>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Laura Miletić

7456/BT

**ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA I
HIDROLATA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Mikrobiologija

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Antimikrobna aktivnost eteričnih ulja i hidrolata izabranih vrsta biljaka

Laura Miletić, 0058210983

Sažetak:

U današnje vrijeme sve su veći zahtjevi potrošača prema prehrambenoj i farmaceutskoj industriji za prirodnijim proizvodima sa što manje dodanih kemijskih agenasa. Eterična ulja i hidrolati su prirodni antimikrobni lijekovi izolirani iz biljnih izvora koji imaju potencijal u borbi protiv mnogih patogenih mikroorganizama koji se prenose hranom i uzrokuju kvarenja.

Ovaj rad donosi pregled antimikrobnih svojstava eteričnih ulja i hidrolata, njihovu kemijsku strukturu i antimikrobnu učinkovitost. Također, navode se najčešće korištene metode određivanja antimikrobne aktivnosti kao i mehanizam djelovanja ulja i hidrolata.

Ključne riječi: eterično ulje, hidrolati, antimikrobna aktivnost, mikroorganizmi

Rad sadrži: 24 stranice, 7 slika, 31 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: Iva Čanak, mag.ing.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Antimicrobial activity of plant hydrolates

Laura Miletić, 0058210983

Abstract:

Nowadays, there are increasing consumer demands towards the food and pharmaceutical industry for more natural products with as few added chemical agents as possible. Essential oils and hydrolates are natural antimicrobial drugs isolated from plant sources that have the potential to fight many food-borne pathogens and cause spoilage.

This paper provides an overview of the antimicrobial properties of essential oils and hydrolates, their chemical structure and antimicrobial efficacy. Also, the most commonly used methods for determining antimicrobial activity as well as the mechanism of action of oils and hydrolates are listed.

Keywords: essential, oil, hydrolate, antimicrobial, activity, microorganisms

Thesis contains: 23 pages, 7 figures, 31 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Frece

Development assistance : Iva Čanak, mag.ing

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. Eterična ulja	2
2.1 Proces dobivanja eteričnih ulja.....	3
2.2 Mehanizam djelovanja eteričnih ulja.....	5
2.3 Kemijski sastav eteričnih ulja i hidrolata	6
2.3.1. Terpeni	6
2.3.2. Esteri	7
2.3.3. Aldehidi.....	8
2.3.4. Ketoni	9
2.3.5. Metoksifenoli.....	10
2.3.6. Cikloeteri.....	11
3. Hidrolati	11
4. Antimikrobna aktivnost.....	12
5. Metode za određivanje antimikrobne aktivnosti.....	15
5.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).....	15
5.2. Metoda difuzije u jažicama	17
6. Pregled recentnih istraživanja antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja	17
7. Pregled recentnih istraživanja antimikrobne aktivnosti hidrolata	19
9. Literatura.....	22

1. UVOD

Povećanje učestalosti nuspojava mnogih sintetičkih antimikrobnih sredstava i učestalost rezistencije bakterija lijekove potaknule su znanstvenike na istraživanje antimikrobnog potencijala koji se nalazi u biljkama, točnije u njihovim eteričnim uljima i nusproduktima, hidrolatima.

Eterična ulja koncentrirani su prirodni ekstrakti dobiveni iz biljaka koji se koriste kao alternativni lijekovi od kraja 12. stoljeća, a postali su rašireniji u drugoj polovici 16. stoljeća. Suvremena kemija omogućila je dublji pristup eteričnim uljima što je rezultiralo mnogim publikacijama radova iz ovog područja tijekom 19. stoljeća. Eterična ulja počela su se postupno koristiti i u proizvodnji parfema, hrane ili pića. Pokazalo se da su dobri izvori bioaktivnih spojeva s antioksidacijskim i antimikrobnim svojstvima. Mnogi dijelovi biljaka sadrže ulja koja se mogu izdvojiti: lišće, sjemenke, kora, smola, bobice, cvijeće, korijenje ili plod.

Antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja pokazuje sve veći interes posljednjih godina i pokazalo se da je učinkovito čak i na sojeve otporne na više lijekova. Mnoge studije usredotočile su se na korisna svojstva eteričnih ulja uključujući antibakterijsku aktivnost. U posljednje vrijeme sve više pažnje je usmjereno i na hidrolate zbog njihovog antimikrobnog djelovanja osobito prema patogenim mikroorganizmima, uključujući bakterije i kvasce. Hidrolati duguju svoju antagonističku aktivnost uglavnom kemijskom sastavu, tj. fenolnim spojevima koji mogu interferirati s mikrobnim membranama, staničnom stijenkom ili enzimima.

Raznolikost proizvoda, proizvodnih procesa te velika mikroba raznolikost omogućili su objavljivanje stotina rezultata, međutim, ovo je još uvijek prilično neistraženo.

Stoga je cilj ovog rada sustavni pregled znanstvene literature o kemijskom sastavu i antimikrobnoj aktivnosti eteričnih ulja i hidrolata izabranih vrsta biljaka.

2. Eterična ulja

Eterična ulja smjese su hlapljivih terpenskih ugljikovodika (alifatskih i cikličkih) i odgovarajućih izoprenoidnih derivata s kisikom, alifatskih i fenilpropanskih spojeva, a nešto rjeđe i heterocikličkih spojeva sa sumporom i/ili dušikom te drugih manje zastupljenih supstancija. Poznato je više od 500 sastavnica eteričnih ulja, a u pojedinim uljima njihov broj može biti veći i od 100. No, uvijek je samo nekoliko sastavnica prisutno u većoj količini, stoga one određuju organoleptička, fizikalna i kemijska svojstva te farmakološki učinak. Koncentracija glavne sastavnice u rasponu je od 20 do 95%, sporedne zauzimaju od 1 do 20%, a koncentracija sastavnica u tragovima manja je od 1%. (Kalodera i sur., 1998)

Eterična ulja nastaju u biljnoj protoplazmi kao produkti disimilacijske izmjene tvari te se izlučuju u posebnim uljnim stanicama, vodovima ili šupljinama smještenim u različitim organima biljke. Iz biljnog materijala mogu se izolirati različitim metodama destilacije, tiještenja ili ekstrakcije, a zbog svojih organoleptičkih svojstava i specifičnih bioloških djelovanja, upotrebljavaju se kao sastojci različitih komercijalnih proizvoda. Sve češće se kao glavni razlog primjene smatra njihova specifična biološka aktivnost. Broj istraživanja koja se provode u svrhu dokazivanja i objašnjavanja njihove djelotvornosti u stalnom je porastu. Točan podatak o načinu dobivanja eteričnog ulja također je iznimno važan budući da primjena različitih metoda može za posljedicu imati i razlike u njihovom sastavu. Metodom destilacije vodom ili vodenom parom dobivaju se ulja koja sadrže isključivo hlapljive sastavnice, dok se postupcima tiještenja i ekstrakcije izdvajaju i teže hlapljivi spojevi. (Kalodera i sur., 1998)

Eterična ulja izdvajaju se među biljnim ekstraktima po cijeni, mirisnim osobinama i činjenici da se iz velike količine biljnog materijala dobije tek mala količina eteričnog ulja. Slabo su topljiva u vodi, no dobro se otapaju u biljnim uljima, voskovima, koncentriranom etanolu i sličnim otapalima. Sva eterična ulja koja se koriste u aromaterapiji moraju biti botanički i kemijski definirana. Botanički definirana ulja podrazumijevaju točno određenu vrstu, eventualno i podvrstu te dio biljke iz kojega su dobivena jer botaničke karakteristike imaju veliki utjecaj na kemijski sastav ulja. Kemijski definirana ulja podrazumijevaju točno definiran udio određenih molekula u eteričnom ulju izražen u postocima koji je prethodno određen kemijskom analizom. (Marković, 2005)

2.1 Proces dobivanja eteričnih ulja

Eterična ulja se najčešće dobivaju procesom destilacije vodenom parom i tiještenjem, a rjeđe direktnim zagrijavanjem biljnog materijala.

Proces destilacije vodenom parom omogućava vrenje komponenata eteričnih ulja pri nižim temperaturama od njihovog vrelišta (150-200°C) te se na taj način znatno smanjuje mogućnost oksidacije koja bi promijenila kemijski sastav ulja. Povećava se ukupni tlak u destilacijskom sustavu uz pomoć vodene pare te on omogućuje da se zajedno s njom destiliraju tvari koje imaju vrelište više od 100 °C. Na taj način destiliraju se tvari koje nisu topljive u vodi, koje imaju do 15 ili maksimalno 20 C- atoma, koje su dovoljno stabilne da izdrže procese zagrijavanja (na 100 °C) te one koje kemijski ne reagiraju s vodom. Uređaj za takvu destilaciju sastoji se od parogeneratora, kotla za destilaciju, kondenzatora i separatora. Vodena para ne proizvodi se zasebno, već se generira u kotlu za destilaciju na način da se biljni materijal zagrijava do vrenja u dva do šest puta većoj količini vode. Voda ne dotiče biljni materijal, već vodena para prolazi kroz njega, odnosi čestice eteričnog ulja sa sobom i prolazi kroz cijev koja je hlađena vodom te na taj način dolazi do kondenzacije vode i eteričnih ulja. Oni se zajedno skupljaju u posebnu posudu, a budući da se esencijalno ulje ne otapa u vodi, slojevi se odjeljuju. Eterična ulja su lakša od vode, pa se skupljaju na površini. Tijekom destilacije vodenom parom treba voditi računa o kvaliteti biljnog materijala, vrsti korištene vode, aparaturi, trajanju, tlaku, temperaturi te procesima izdvajanja eteričnog ulja. (Marković, 2005)

U procesu tiještenja se biljka ili dio biljke buši sitnim iglama ili preša kako bi se oslobodio sadržaj iz žlijezda. Materijal se miješa s vodom, a ulje se odvaja od ostatka biljne mase npr. centrifugiranjem. Dobiveni ekstrakt, eterično ulje, nepromijenjeni je sadržaj žlijezde. Tako dobiveno eterično ulje sastoji se od hlapljive i nehlapljive faze. Hlapljiva ili dominantna faza je ona koja sadrži spojeve kao što su esteri, monoterpeni i aldehidi, dok nehlapljiva faza sadrži flavonoide, neke furanokumarine, masne kiseline, di-, tri- i tetraterpene. (Marković, 2005)

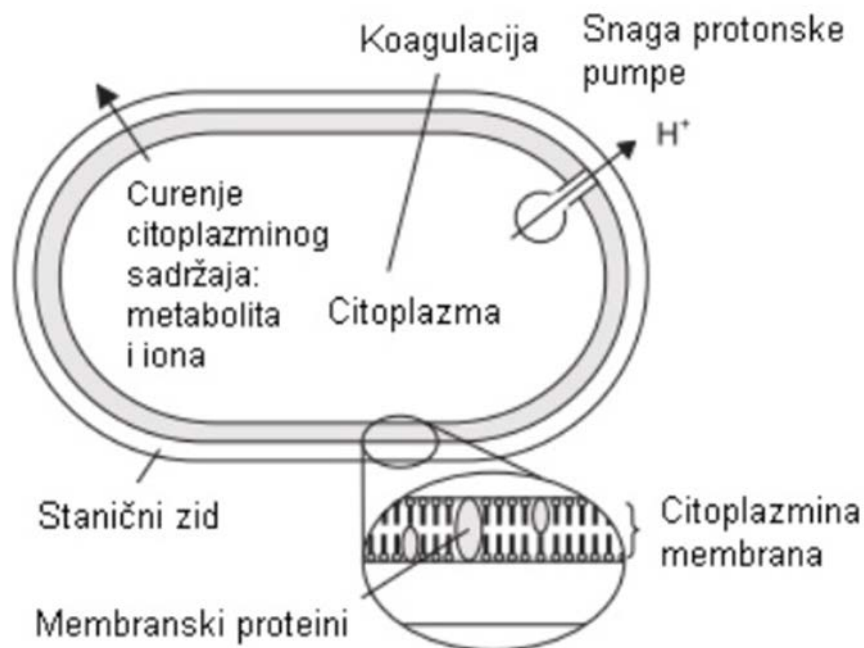
Nakon destilacije eterična ulja mogu sadržavati frakcije određenih spojeva koje je potrebno ukloniti.

Deterpenizacija je proces uklanjanja ugljikovodika koji su skloni oksidiranju i polimeriziranju, a provodi se pranjem alkalnim lužinama i ekstrakcijom smjesom etanola i vode. Nadalje, neka eterična ulja sadrže male količine vode zbog koje dolazi do hidrolize estera i brže oksidacije nekih ugljikovodika. To se može dogoditi prilikom odvajanja eteričnog ulja od hidrolata. Za uklanjanje vlage iz eteričnih ulja provodi se sušenje bezvodnim natrijevim sulfatom budući da on ne reagira s eteričnim uljem niti mijenja njegova kemijska svojstva. Ako je eterično ulje potrebno obogatiti glavnim aktivnim spojevima, koristi se proces redestilacije, tj. ponavlja se proces destilacije vodenom parom.

Za kvalitetu eteričnih ulja vrlo je bitno njihovo skladištenje. Čuvaju se u posudama od nehrđajućeg čelika, aluminija ili posudama presvučenim inertnim polimerima koji ne reagiraju s molekulama eteričnog ulja. Optimalna temperatura skladištenja je 15-20 °C. Pri nižim temperaturama može doći do kondenzacije vode unutar spremnika i kontaminacije s vodom. Također je bitna zaštita od kisika prisutnog u zraku koji potiče oksidaciju eteričnih ulja. To se može smanjiti tako da se posuda napuni do kraja da prisutnost kisika bude što manja. (Marković, 2005)

2.2 Mehanizam djelovanja eteričnih ulja

Eterična ulja sastoje se od velikog broja različitih kemijskih spojeva, stoga postoje različiti mehanizmi njihova djelovanja. Eterična ulja mogu izazvati trajno oštećenje stanične membrane, translokaciju njezinih proteina i poremećaj u transportu elektrona. Posljedica toga je izlazak staničnih sastojaka u izvanstanični prostor, nepovratno oštećenje i smrt stanice. Također mogu izazvati i promjene u sintezi DNK i RNK, koagulaciju staničnog sadržaja ili spriječiti proizvodnju toksina. Eterična ulja i njihovi sastojci pokazuju važno svojstvo hidrofobnosti koje im omogućuje raspodjelu između lipida stanične membrane i mitohondrija bakterijske stanice te narušavajući pritom strukturu i čineći ih propusnijima (Burt, 2004). Promjena propusnosti stanične membrane utječe i na gubitak osmotske kontrole stanice što se smatra osnovnim principom antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja. Također, zbog sadržaja fenolnih spojeva kao što su karvakrol, eugenol i timol posjeduju dobru antifungalnu aktivnost (Burt, 2004). Ovisno o sastavu eteričnog ulja, a posebno njegovom sadržaju fenolnih spojeva, eterična ulja pokazuju različite razine citotoksičnosti.

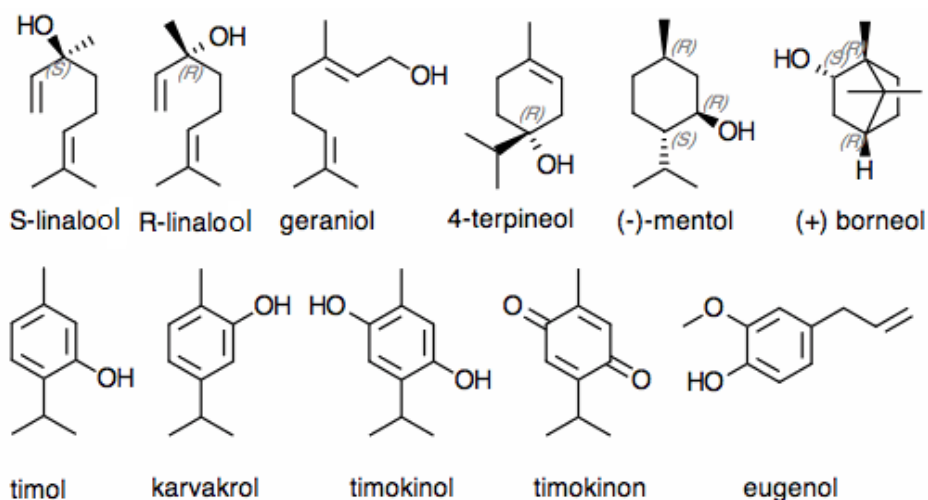


Slika 1 – Mehanizam djelovanja eteričnih ulja na stanicu mikroorganizama (Burt, 2004)

2.3 Kemijski sastav eteričnih ulja i hidrolata

2.3.1. Terpeni

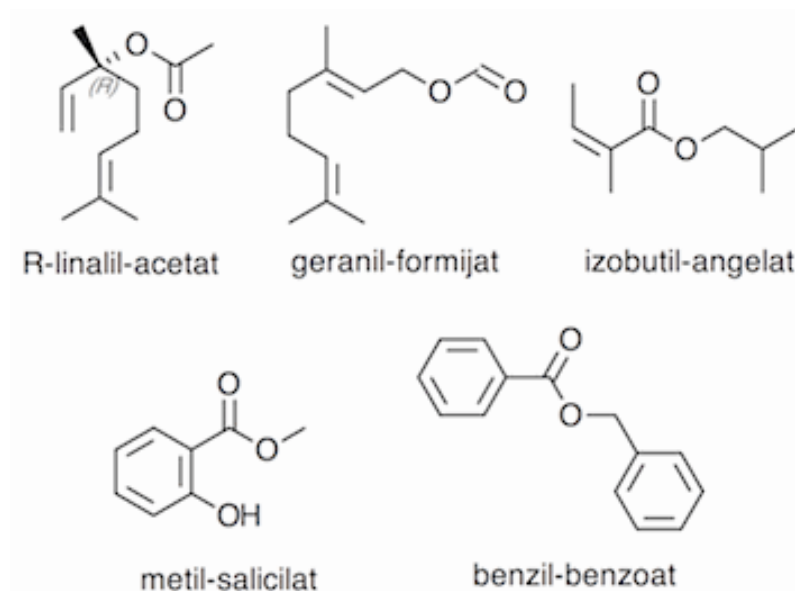
Terpeni su strukturno najraznolikiji razred biljnih prirodnih produkata te ih postoji preko 30000. Izoprenska jedinica je biosintetska osnova svih terpena, a molekulske je formule C_5H_8 . Nadalje, molekulska formula poliizoprena je $(C_5H_8)_n$ pri čemu se n smatra brojem vezanih izoprenskih jedinica, a takvo pravilo nazvano je izoprenskim, odnosno C_5 -pravilom. Izoprenske jedinice međusobno se povezuju u linearne lance ili prstenove. U biosintezi sudjeluju izopentenil-pirofosfat (IPP) i dimetilalil-pirofosfat (DMAPP), aktivni oblici izoprena. Glavni trpeni u eteričnim uljima su monoterpeni (C_{10}) i seskviterpeni (C_{15}). Uz njih se također nalaze i diterpeni (C_{20}), triterpeni (C_{30}) i tetraterpeni (C_{40}). Najčešće sastavnice eteričnog ulja su monoterpeni alkoholi i fenoli. (Bruneton, 1993). Unatoč tome što se eterična ulja i njihovi odgovarajući hidrolati slažu u sastavu glavnih komponenata, neke komponente izostaju u hidrolatu. Primjerice, kod vrste *Thymbra capitata* neke komponente, poput α -terpinena, mircena, kamfena i limonena su nedostajale u njezinom hidrolatu, dok su u eteričnom ulju bili prisutni. Većina tih spojeva je netopljiva u vodi, dok neki brzo nestaju iz hidrolata s različitim mehanizmima razgradnje.



Slika 2 – Monoterpeni alkoholi i fenoli prisutni u eteričnim uljima i hidrolatima
<<https://www.plantagea.hr/aromaterapija/kemizam-i-djelovanje-etericnih-ulja/>>
pristupljeno 30. Lipnja 2020.

2.3.2. Esteri

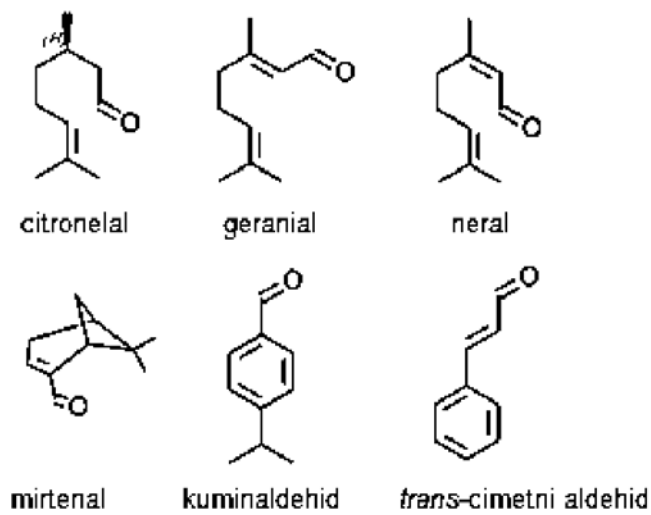
Esteri su spojevi koji nastaju prilikom reakcije karboksilne kiseline s alkoholom. Esteri u eteričnim uljima obično su malih molekulskih masa, ugodnog, intenzivnog mirisa, pa tako eterična ulja bogata njima imaju ugodan, slatkast miris. Reakcija nastajanja estera je reverzibilna, kontinuirano nastaju ester i voda, a istodobno se ester raspada. Esteri su dominantne komponente nekih eteričnih ulja uz alkohole i fenole. Vrlo često ulja bogata esterima sadrže i alkohol iz kojeg ester nastaje (Bruneton, 1993). U usporedbi kemijskog sastava eteričnog ulja i hidrolata vrste *Lavandula angustifolia* jedna od glavnih komponenti eteričnog ulja, linalil acetat, nije pronađena u hidrolatu. (Šmigielski i sur., 2013)



Slika 3 – Esteri prisutni u eteričnim uljima i hidrolatima
<<https://www.plantagea.hr/aromaterapija/kemizam-i-djelovanje-etericnih-ulja/>>
pristupljeno 30. lipnja 2020.

2.3.3. Aldehidi

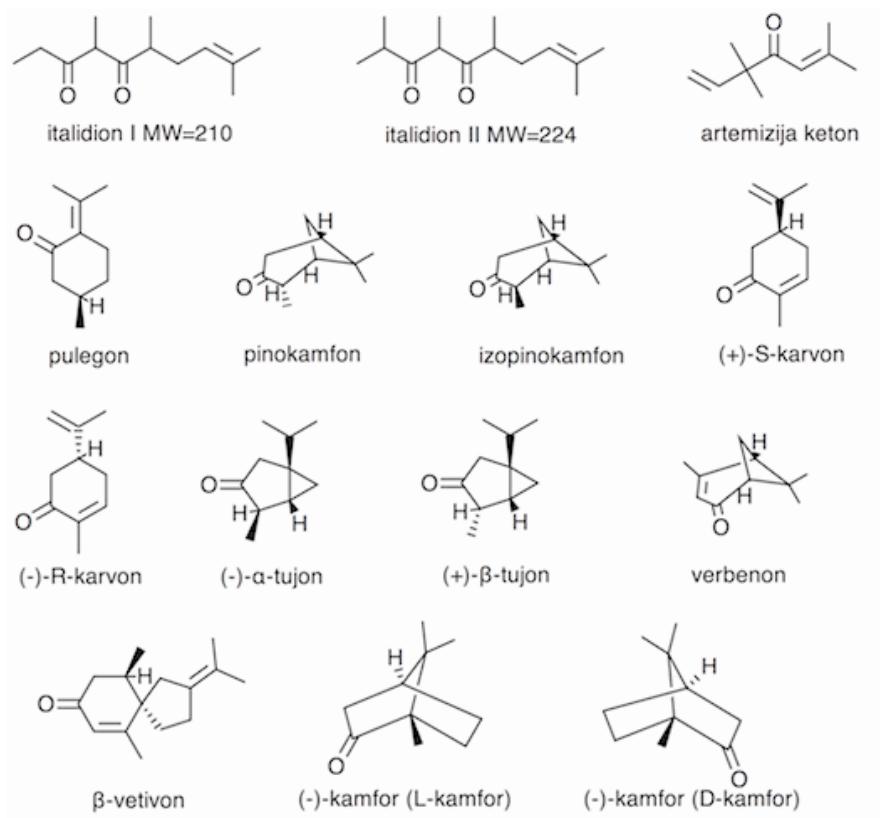
Aldehidi su kemijski spojevi koji nastaju oksidacijom primarnih alkohola. Poznati su po svojoj velikoj reaktivnosti. Iako je njihov predstavnik formaldehid (formalin) vrlo toksičan, aldehidi koji se nalaze u eteričnim uljima nisu toksični (Bruneton, 1993).



Slika 4 – Aldehidi prisutni u eteričnim uljima i hidrolatima
<<https://www.plantagea.hr/aromaterapija/kemizam-i-djelovanje-etericnih-ulja/>>
pristupljeno 30. lipnja 2020.

2.3.4. Ketoni

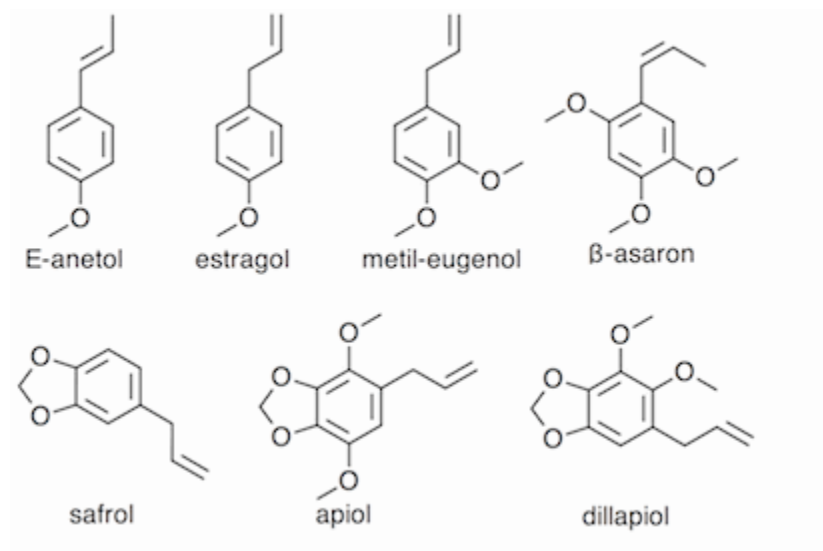
Ketoni su kemijski spojevi koji sadrže karakterističnu keto skupinu, a nastaju oksidacijom sekundarnih alkohola. Mogu biti toksični, pa su tako neka vrlo toksična eterična ulja bogata ketonima. Primjeri toksičnih ketona su pinokamfon i izopinokamfon i to u eteričnom ulju miloduha (*Hyssopus officinalis L.*) (Bruneton, 1993).



Slika 5 – Ketoni prisutni u eteričnim uljima i hidrolatima
<<https://www.plantagea.hr/aromaterapija/kemizam-i-djelovanje-etericnih-ulja/>>
pristupljeno 30. lipnja 2020.

2.3.5. Metoksifenoli

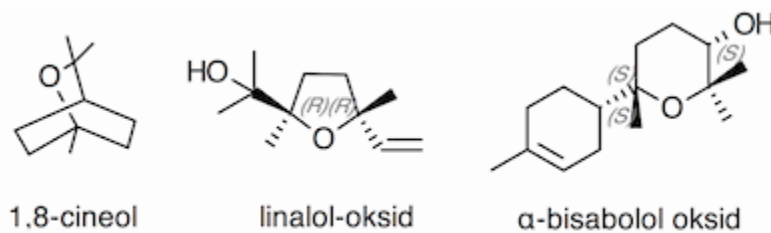
Metoksifenoli su metilni eteri fenola. Vodik prisutan u fenolnoj skupini djeluje kao kiselina te daje svojstvo iritativnosti i omogućuje antimikrobno djelovanje. Metoksifenoli imaju manjak vodika, pa su manje iritativni i slabijeg antimikrobnog djelovanja. Najpoznatiji predstavnici su estragol i E-anetol. Estragol je prisutan u eteričnom ulju bosiljka (*Ocimum basilicum L.*) i estragona (*Artemisia dracunculus L.*), a E-anetol se može naći u eteričnim uljima komorača (*Foeniculum vulgare Mill.*) i anisa (*Pimpinella anisum L.*) (Bruneton, 1993).



Slika 6 – Metoksifenoli prisutni u eteričnim uljima i hidrolatima
<<https://www.plantagea.hr/aromaterapija/kemizam-i-djelovanje-etericnih-ulja/>>
pristupljeno 30. lipnja 2020.

2.3.6. Cikloeteri

Cikloeteri (oksidi) vrlo su rasprostranjeni u eteričnim uljima. Glavni i najzastupljeniji spoj koji pripada ovoj skupini je 1,8-cineol. 1,8-Cineol je monoterpenski cikloeter koji se nalazi u eteričnim uljima mnogih vrsta rodova eukalitpusa (*Eucalyptus*), čajevca (*Melaleuca*), ulju ravensare (*Cinnamomum camphora* L.) timijana (*Thymus vulgaris* L.) (Bruneton, 1993).



1,8-cineol

linalol-oxid

α -bisabolol oksid

Slika 7 – Cikloeteri prisutni u eteričnim uljima i hidrolatima
<<https://www.plantagea.hr/aromaterapija/kemizam-i-djelovanje-etericnih-ulja/>>
pristupljeno 30. lipnja 2020.

3. Hidrolati

Hidrolati su spojevi koji nastaju kao nusprodukt u proizvodnji eteričnih ulja. Prilikom destilacije eteričnih ulja vodena se para hladi, tj. kondenzira zajedno s eteričnim uljem. Budući da su eterična ulja vrlo slabo topljiva u vodi, obično ostaju plivati na sloju vode koji je zasićen tvarima iz eteričnih ulja. Dobivenoj mirisnoj vodici, hidrolatu, svojstvena su ljekovita obilježja. Nakon procesa destilacije i odvajanja eteričnog ulja od hidrolata, nije ga dovoljno samo spremiti i povremeno uzimati budući da su hidrolati vodeni mediji koji lako mogu biti mikrobiološki kontaminirani. Neki od njih sadrže snažne antimikrobne tvari iz samog eteričnog ulja te mogu biti dovoljno konzervirani tim tvarima. Međutim, većina hidrolata ima vrlo male količine antimikrobnih tvari te se može pokvariti uz pojavu mutnoće, taloga i

neugodnog mirisa. Odmah nakon destilacije hidrolate je potrebno sterilizirati filtracijom kroz filter s porama veličine 200 nm.

Udio eteričnog ulja u hidrolatu ovisi o hidrofilnim komponentama u eteričnom ulju te iznosi 0.05 – 0.2 mL/L hidrolata. Hidrolati se koriste zbog toga što su ljudima dovoljne i učinkovite manje koncentracije eteričnih ulja s obzirom na to da tijelo nije u mogućnosti prihvatiti veće koncentracije. U kozmetičke svrhe koriste se kao prirodni tonici ili kao vodena faza u izradi krema, gelova, emulzija i maski. Osim u kozmetici, hidrolati se mogu koristiti u kulinarstvu i u terapijske svrhe kao kapi za nos, oči, uši kao te za vaginalna ispiranja. Obično imaju pH vrijednost 4.5 - 5.5 što je bitno zbog toga što pH vrijednost utječe na terapijske učinke samog hidrolata (Schorr, 2004; Paolini i sur., 2008).

4. Antimikrobna aktivnost

4.1. Eterična ulja

Biljke za obranu od patogenih mikroorganizama proizvode razne molekule koje su nastajale tijekom stotina milijuna godina evolucijskog odabira. Među njima očuvane su molekule koje su bile najaktivnije protiv bakterija, tj. protiv kojih bakterije nisu uspjele razviti rezistenciju.

Jedan od mehanizama koji bi mogli poboljšati učinak eteričnih ulja je direktno mikrobicidno djelovanje koje se postiže većim dozama ulja. Nadalje, inhibitorno djelovanje na proliferaciju je takvo da u nižoj dozi eterična ulja sprječavaju razmnožavanje bakterija, ali ih pritom ne ubijaju. Na taj način se pomaže imunološkom sustavu da sam izliječi infekciju. Primjenjuje se i smanjenje patogenog potencijala bakterije budući da u još nižim dozama eterično ulje ometa čimbenike koji pomažu razmnožavanju bakterija u tkivima poput produkcije sluzi kojom se lijepe za tkivo. Također, učinak je moguće poboljšati djelovanjem stimulirajuće na imunološki sustav, odnosno smanjujući pretjeranu upalu koja oštećuje tkivo, djelovanjem na cijeli organizam na način da pomažu u funkcioniranju organskih sustava za izlučivanje te djelovanjem na središnji živčani sustav smanjujući depresivna raspoloženja koja nastaju kao posljedica kroničnih infekcija. (Marković, 2005)

Najpoznatije i najčešće korišteno antimikrobno svojstvo eteričnih ulja je njihovo antibakterijsko djelovanje za koje su zaslužni fenolni spojevi. Antibakterijsko djelovanje

fenola ovisi o primijenjenoj koncentraciji. Pri nižim koncentracijama djeluju na enzime koji su uključeni u proizvodnju energije, a pri višim koncentracijama denaturiraju proteine (Tiwari i sur., 2009) Uočena je manja osjetljivost gram-negativnih bakterija na djelovanje eteričnih ulja u odnosu na gram-pozitivne bakterije budući da gram-negativne bakterije posjeduju hidrofilni lipopolisaharidni omotač koji ograničava difuziju hidrofobnih spojeva (Burt, 2004).

Osim antibakterijskog djelovanja eteričnih ulja poznata je i njihova antifungalna aktivnost. Kod plijesni dolazi do narušavanja strukture stanične membrane, blokiranja njezine izgradnje te inhibiranja klijanja spora, rasta micelija i staničnog disanja što dovodi do smrti stanice (Harris i sur., 2002).

Također, eterična ulja denaturiraju virusne strukturne proteine ili glikoproteine. Pretpostavlja se da antivirusni mehanizam uključuje interferenciju s virusnom ovojnicom, inhibiciju specifičnih procesa u ciklusu replikacije ili djelovanje na virusne sastojke potrebne za apsorpciju i ulazak u stanice domaćina sprječavajući difuziju virusa u stanicu (Saddi i sur., 2007).

Antimikrobna aktivnost eteričnog ulja može se u potpunosti razlikovati od aktivnosti njegovih pojedinačnih sastojaka jer ovisi o složenim interakcijama među sastojcima. Istraživanja provedena na nekim eteričnim uljima pokazala su da manje zastupljeni sastojci ulja imaju ključnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti što se pripisuje sinergističkom djelovanju s drugim sastojcima. Zbog toga, eterična ulja u punom sastavu posjeduju jače izražena antimikrobna svojstva nego njihovi pojedinačni, glavni sastojci (Burt, 2004).

Antimikrobne sastavnice iz biljaka danas su dobra zamjena sintetskim konzervansima. Za razliku od antibiotika kod kojih se radi samo o jednoj aktivnoj tvari protiv kojih bakterija treba razviti rezistenciju, eterična ulja su smjese tvari različitih mehanizama djelovanja. Zbog toga bakterije još uvijek nisu uspjele razviti rezistenciju na eterična ulja.

4.2. Hidrolati

Poznavanje određenog kemotipa hidrolata od temeljnog je značaja za razumijevanje mehanizama njegovog biološkog djelovanja i što bolje primjene. Primjerice, fenolni spojevi poput karvakrola i timola, prepoznati su kao jaka antibakterijska sredstva (Lambert i sur., 2001). To su hidrofobne molekule koje imaju tendenciju miješanja s vanjskom membranom bakterija, inducirajući oslobađanje lipopolisaharida. Također imaju utjecaj na strukturnu i funkcionalnu aktivnost citoplazmatske membrane, u interakciji s lipidnim dvoslojem.

Karvakol sudjeluje u sintezi lanaca masnih kiselina, uzrokujući širenje i destabilizaciju strukture membrane, povećavajući njenu fluidnost i propusnost te uzrokujući istjecanje unutarstaničnog sadržaja (Burt, 2004; Ultee i sur., 1999). Nakon kontakta s karvakrolom, bakterijske stanice mijenjaju svoju veličinu, duljinu i promjer. Slijedom reakcija, formiranje kanala u membrani omogućava prolazak iona, staničnog materijala, ATP-a i nukleinskih kiselina. Nadalje, karvakrol uzrokuje smanjenje koncentracije ATP-a smanjenjem njegove proizvodnje i povećanjem hidrolize (Ultee i sur., 1999).

Neki su autori primijetili su da se hidroksilne skupine eugenola mogu interferirati s proteinima i tako spriječiti djelovanje mikrobnih enzima, štoviše, da se karbonil skupina kinomaldehida može lijepiti za proteine te spriječiti djelovanje aminokiselinskih dekarboksilaza (Nandanie i sur., 1993).

Tri-ketoni su spojevi prirodnog podrijetla, odgovorni za antimikrobnu aktivnost biljnih derivata koji ih sadrže. Zbog svoje hidrofobnosti u prirodi uništavaju citoplazmatsku membranu i posljedično neke temeljne sustave za vitalnost stanice poput lanca transporta elektrona i ATP-sintaze. Mehanizam kojim dolazi do ovih promjena još uvijek nije poznat (King, 2002).

Još jedan spoj hidrolata, farnesol, posjeduje antibakterijsku aktivnost zbog svoje hidrofobne prirode. Ova karakteristika omogućuje njegovo nakupljanje u staničnoj membrani te uzrokuje oslobađanje unutarstaničnog materijala (Jabra-Rizk i sur., 2006). Nekoliko studija pokazalo je da niske koncentracije farnesola potiču smanjenje proizvodnje biofilma i stvaranje biofilma tijekom vremena (Alves i sur., 2009; Gomes i sur., 2011).

Fenolni spojevi poput timola, eugenola, karvona i kinomaldehida također pokazuju snažnu antifungalnu aktivnost. Posjeduju sposobnost inhibiranja proizvodnje fumonizina.

Fenolni spojevi mogu inhibirati proizvodnju aflatoksina mijenjanjem modulatora sinteze mikotoksina ili putanje transdukcijskog signala (Samapundo i sur., 2007; Dambolena i sur., 2008; Holmes i sur., 2008). Timol ima sposobnost utjecaja na morfologiju micelija, uzrokujući promjene u položaju hitina u hifama. (Morcia i sur., 2012).

5. Metode za određivanje antimikrobne aktivnosti

Najčešće korištene metode određivanja antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata su metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i metoda difuzije u jažicama. Prilikom korištenja bilo koje od navedenih metoda potrebno je da sve otopine, pribor i posude bude sterilizirano.

5.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

MIC vrijednost podrazumijeva najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa koja potpuno inhibira rast mikroorganizama. Tijekom izvođenja mikrodilucijske metode koriste se sterilne mikrotitarske pločice s 96 jažica. Testirani uzorci (prethodno razrijeđeni određeni broj puta u sterilnoj vodi) serijski se razrjeđuju u bujonu duž pločice na način da se 50 μL uzorka prenese u svaki sljedeći otvor na pločici koji sadrži 50 μL odgovarajućeg bujona te izmiješa i tako sve do kraja mikrotitarske pločice. Primjenom ovakvog razrjeđivanja, početna koncentracija testiranog uzorka se razrijedi duž pločice tako da je svaka sljedeća koncentracija 50% niža od prethodne. Konačni volumen u svakoj jažici nakon razrjeđivanja je jednak i iznosi 50 μL . Kao kontrola na svakoj se pločici pripremi slijepa proba (100 μL bujona), pozitivna kontrola (50 μL bujona + 50 μL bakterijske kulture), negativne kontrole za svaki uzorak i korišteno otapalo (50 μL bujona + 50 μL razrijeđenog ekstrakta). Zatim se u sve jažice mikrotitarske pločice, osim u slijepu probu i negativne kontrole, doda 50 μL ispitivanih kultura bakterija. Nakon dodatka bakterijskih kultura, pločice se izmiješaju i nakon 24-satne inkubacije (37 °C) u svaku se jažicu doda 10 μL indikatora INT, otopine jodonitrotetrazolium klorida, te se pločice stave još 30 minuta na inkubaciju (37 °C). Nakon inkubacije vizualno se očitavaju rezultati tako da se prati pojava crvenog obojenja u jažicama. MIC vrijednost je ona koncentracija uzorka, tj. ekstrakta, koja je prisutna u prvoj

nezamućenoj jaŹici pazeći pritom da pri istim uvjetima pozitivna i negativna kontrola prikazuju odgovarajući rezultat. (Balour i sur., 2015; Skroza, 2015). U tablici 1 nalazi se prikaz MIC koncentracija za najćešće patogene koji se prenose hranom.

Tablica 1. MIC eterićnih ulja ili njihovih komponenti u *in vitro* testovima za bakterije koje se prenose hranom (Burt, 2004).

Biljka/eterićno ulje/sastojak	Vrsta bakterija	MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) / $\mu\text{L/mL}$
RuŹmarin	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	4.5 - 10 >20 0.2 0.4 - 10 0.2
Origano	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	0.5 - 1.2 1.2 0.5 - 1.2
Kurkuma	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus cereus</i>	0.2 0.2
Karvakrol	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	0.225 - 5 0.225 - 0.25 0.175 - 0.450 0.375 - 5
Timol	<i>Escherichia coli</i> <i>Sakmonella typhimurium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Bacillus cereus</i>	0.225 - 0.45 0.056 0.140-0.225 0.450 0.450
Eugenol	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	1.0 0.5 1.0

5.2. Metoda difuzije u jažicama

Metoda difuzije u jažicama široko se koristi za procjenu antimikrobne aktivnosti biljaka ili mikrobnih ekstrakata. Slično postupku koji se primjenjuje u disk difuzijskoj metodi, površina agar ploče inokulira se mikrobnom kulturom i razmaže po cijeloj površini agara. Zatim se aseptično izbuši rupa s promjerom od 6 do 8 mm u jažicu se doda volumen (20–100 µL) antimikrobnog sredstva ili ekstrakta otopine u željenoj koncentraciji. Ploče se inkubiraju u optimalnim uvjetima, ovisno o ispitivanom mikroorganizmu. Antimikrobno sredstvo difundira u agaru i inhibira rast ispitivanog mikrobnog soja. Antimikrobna aktivnost izražava se kao srednja vrijednost inhibicijske zone (mm) koju proizvede ispitivana supstanca. Ako je zona inhibicije ≥ 12 mm, smatra se da biljni ekstrakt ima dobar inhibitorski učinak. (Koohsari i sur., 2013; Balour i sur., 2015)

6. Pregled recentnih istraživanja antimikrobne aktivnosti eteričnih ulja

Palfi i sur. (2018) su u svom radu ispitivali utjecaj eteričnih ulja anisa (*Pimpinella anisum L.*), paprene metvice (*Mentha x piperita L.*), bosiljka (*Ocimum basilicum L.*), ružmarina (*Rosmarinus officinalis L.*), prave lavande (*Lavandula angustifolia Mills.*) i njihovih najzastupljenijih komponenti (anetola, estragola, mentola, mentona, eukaliptola, pinena alfa plus, linalola i linalil-acetatana) na rast micelija fitopatogene gljive *Colletotrichum coccodes*. Osmi dan nakon inokulacije eterična ulja anisa, paprene metvice, prave lavande, bosiljka te komponenta anetol potpuno su inhibirali rast micelija, međutim petnaesti dan smanjilo se njihovo inhibitorsko djelovanje te je tako potvrđena od ranije poznata činjenica da se inhibitorski učinak eteričnih ulja smanjuje s duljim vremenom inkubacije. Također, potvrđeno je i da antifungalna aktivnost eteričnih ulja i njihovih komponenti ovisi o primijenjenoj količini, odnosno koncentraciji. U ovom istraživanju najjači inhibitorski učinak pokazalo je eterično ulje anisa, zatim paprene metvice i lavande. Većina pojedinačnih ispitivanih komponenti eteričnih ulja nije u potpunosti inhibirala rast micelija *C. coccodes*. iz čega se može zaključiti da inhibitorski učinak eteričnih ulja ovisi o svim njihovim komponentama te je zbog toga najčešće učinak pojedinih komponenti ulja slabiji od učinka ulja.

Haddouchi i sur. (2013) su istraživali utjecaj eteričnih ulja četiri različite vrste biljke rute koje pripadaju obitelji *Rutaceae* (*R. chalepensis var. bracteosa*, *R. graveolens L.*, *R. angustifolia*

Pers te *R. tuberculata* Forsk) na neke gram pozitivne, gram negativne bakterije te kvasce. Kao test organizmi odabrani su: gram pozitivne bakterije: *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacea*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*; gram-negativne bakterije: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium* *Citrobacter freundii*; kvasci: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*.

Dobiveni rezultati pokazali su da eterična ulja ispitivane vrste nemaju velik potencijal antibakterijskog djelovanja na svih 12 bakterija. Najveći inhibitorni učinak zabilježen je kod vrsta *R. chalepensis* var. *bracteosa*, *R. graveolens* L. te *R. tuberculata* Forsk prema mikroorganizmima *S. aureus* i *S. typhi*. Za ulje *R. angustifolia* nije otkriveno antibakterijsko djelovanje ni na jednom od testiranih mikroorganizama. Nadalje, sve četiri vrste pokazale su stalne antifungalne učinke na sve testirane gljivične mikroorganizme.

Sonboli i sur. (2004) istraživali su antimikrobno djelovanje eteričnih ulja kadulje, tri vrste roda *Salvia* L. (*S. mirzayanii*, *S. hydrangea* i *S. santolinifolia*) koji pripadaju porodici *Lamiaceae*. Korišteni test mikroorganizmi bili su bakterije *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* te kvasci *Aspergillus niger*, *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*. Sve tri vrste ulja pokazale su antimikrobnu aktivnost disk difuzijskom metodom. Međutim, najbolji rezultati postignuti su uljem *S. mirzayanii* koja je aktivnost pokazala ne samo prema bakterijskim sojevima, već je dobre zone inhibicije stvorila i u kontaktu s ispitivanim kvascima. Najosjetljiviji sojevi bili su: *B. subtilis* i *S. epidermidis*, *A. niger* i *C. albicans*. Bakterija *K. pneumoniae* pokazala je malu osjetljivost na ulja *S. santolinifolia* i *S. mirzayanii*, dok je soj *P. aeruginosa* bio otporan na sva ulja osim ulja *S. mirzayanii*.

Hanamanthagouda i sur. (2010) ispitivali su antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja lavande vrste *Lavandula bipinnata* prema bakterijama *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. subtilis* i *Micrococcus* te kvascima *Penicillium notatum*, *A. niger* i *C. albicans*. Ovo eterično ulje pokazalo je jaku antimikrobnu aktivnost prema *B. subtilis*, *S. aureus*, *Micrococcus*, *A. niger*, umjerenu prema *E. coli*, *S. dysenteriae*, *E. faecalis*, *C. albicans* i nisku prema *P. aeruginosa* i *P. notatum*. Dokazano je da ovo eterično ulje posjeduje bolju antibakterijsku nego antifungalnu aktivnost.

7. Pregled recentnih istraživanja antimikrobne aktivnosti hidrolata

Acheampong i sur. (2015) ispitivali su antimikrobnu aktivnost hidrolata svježeg i osušenog lišća vrsta citronella (*Cymbopogona nardus*), siam korova (*Chromolaena odorata*), bosiljka (*Ocimum gratissimum*), limunske trave (*Cymbopogon citratus*) i kore svježe i suhe naranče (*Citrus sinensis*) te limete (*Citrus aurantifolia*) na mikroorganizme *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *B. subtilis* i *E. faecalis*. Dobiveni rezultati pokazali su da hidrolati osušenog i svježeg lišća citronelle, osušene i svježe kore naranče, osušenog lišća siam korova i svježeg lišća limunske trave nisu inhibirali niti jedan test mikroorganizam. Nadalje, hidrolati osušenog lišća limete bili su u stanju inhibirati samo *S. aureus*, dok su oni iz svježeg lišća siam korova inhibirali *S. aureus* i *B. subtilis*, ali ne i ostale. Hidrolat kore svježeg voća limete bio je jedini sposoban inhibirati sve ispitivane organizme. Iz ovih rezultata može se zaključiti da postoje razlike u antimikrobnoj aktivnosti između hidrolata svježih i osušenih uzoraka iste biljke. Visoka antimikrobna aktivnost svježe kore limete dijelom može biti posljedica većeg sadržaja fenola i flavonoida u ovom hidrolatu. Rezultati su također otkrili da hidrolati koji inhibiraju gram negativnu *E. coli* također inhibiraju i gljivice (*C. albicans*) i većinu gram pozitivnih sojeva (*B. subtilis*, i *E. faecalis*). Međutim, nisu svi hidrolati koji su inhibirali gram pozitivne sojeve bili su u stanju inhibirati gram negativnu *E. coli*.

Nadalje, u istraživanju autora Al-Turki (2007) otkriveno je da hidrolati timijana (*Thymbra spicata*), metvice (*Mentha piperita* L.), kadulje (*Salvia fruticosa*), crnog papra (*Piper nigrum* L.) i češnjaka (*Allium tuberosum*) mogu inhibirati uobičajene patogene bakterije koje se susreću u hrani, poput *B. subtilis* i *Salmonella enteritidis*, stoga se ti hidrolati koriste kao prirodni dodatci hrani i/ili kao hrana za poboljšanje zdravlja crijeva ljudi i životinja. Nakon provedenog istraživanja dobiveni rezultati pokazali su kako svi biljni hidrolati imaju inhibirajuće djelovanje (promjer zone inhibicije 10-30 mm) prema testiranim bakterijama. Hidrolati češnjaka pokazali su najveće, a hidrolati crnog papra i metvice najniže antibakterijsko djelovanje prema bakterijama *B. subtilis* i *S. enteritidis*.

Oral i sur. (2008) autori su studije čiji je cilj bio istražiti antimikrobnu aktivnost hidrolata timijana (*Thymus serpyllum*), ruja (*Rhus aromaticus*), klinčića (*Syzygium aromaticum*), koprive (*Urtica dioica*), angelike (*Angelica archangelica*), bagrema (*Robinia pseudoaccacia*), hrasta valonija (*Quercus ithaburensis*), kadulje (*Salvia officinalis*), smreke (*Juniperus communis*), ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), ehinacee (*Echinacea purpurea*), zelenog čaja (*Camelia sinensis*), bosiljka (*Ocimum basilicum*), mirte (*Myrtus communis*), oraha (*Juglans regia*), lovora (*Laurus nobilis*), metvice (*Mentha longifolia*), slamke (*Helichrysum plicatum*),

tratinčice (*Anthemis nobilis*) i pljuskevica (*Hypericum perforatum*) prema mikroorganizmima *Aeromonas hydrophila*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* i *E. coli* koje imaju ulogu u kvarenju slatkovodnih riba. Nakon provedenog istraživanja hidrolati timijana, klinčića i ružmarina pokazali su značajnu antimikrobnu aktivnost prema test mikroorganizmu *A. hydrophila*, dok je rast *P. fluorescens* značajno inhibiran dodatkom hidrolata timijana, klinčića i ružmarina te hidrolatima borovice, mirte i metvice. Bakterija *E. coli* bila je najotpornija od ispitivanih bakterija, a svi su navedeni hidrolati, izuzev klinčića i timijana, uspjeli inhibirati njezin rast.

Wysocka i sur. (2012) ispitivali su antifungalnu aktivnost hidrolata metvice s naboranim listovima (*Mentha crispa L.*). Antifungalna aktivnost ispitana je na šest sojeva potencijalno patogenih i toksičnih gljiva: *A. fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum* i *Penicillium cyclopium*. Rezultati su pokazali da antifungalna aktivnost hidrolata značajno ovisi o njegovoj koncentraciji u mediju te o ispitivanom soju budući da je primijenjeni hidrolat u dozi od 15% pokazao jači učinak na rast gljivica u odnosu na onaj u dozi od 10 %. Također, utvrđeno je da se utjecaj hidrolata na rast ispitivanih gljivica razlikuje. Dok je rast plijesni *B. cinerea* i *P. cyclopium* stimuliran, prema ostalim sojevima hidrolat je pokazao inhibicijski učinak. Najveća inhibicija zabilježena je za vrstu *A. fumigatus*.

8. Zaključak

Eterična ulja i hidrolati posjeduju antibakterijska, antifungalna, antivirusna, insekticidna i antioksidacijska svojstva te su zbog toga i zbog svog prirodnog sastava sve više istraživane i cijenjene supstance. Budući da mikroorganizmi sve više razvijaju otpornost na antibiotike sužavajući im područje upotrebe, eterična ulja i hidrolati mogu postati sve bolja alternativa kako u farmaceutskoj, tako i u prehrambenoj industriji. Potrebno je istražiti što više različitih biljaka kako bi se za svaki novi potencijalni problem moglo naći prirodno rješenje u namjeri da se koristi manje kemijskih sredstava koja osim što nisu povoljna za okoliš, stvaraju mnogo otpada, te kako bi se smanjilo širenje patogenih mikroorganizama otpornih na lijekove budući da je to jedna od najvećih prijetnji za uspješno suzbijanje mikrobnog rasta.

9. Literatura

- Acheampong A., Borquaye L. S., Acquah S. O., Osei-Owusu J., Tuani G. K. (2015) Antimicrobial activities of some leaves and fruit peels hydrosols. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science* **1.3**: 158-162
- Al-Turki A. I. (2007) Antibacterial effect of thyme, peppermint, sage, black pepper and garlic hydrosols against *Bacillus subtilis* and *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Agriculture and Environment* **5.2**: 92
- Alves A. S., Adão H., Patrício J., Neto J. M., Costa M. J., Marques J. C. (2009) Spatial distribution of subtidal meiobenthos along estuarine gradients in two southern European estuaries (Portugal). *Marine Biological Association of the United Kingdom. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **89.8**: 1529
- Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis* **6.2**: 71-79
- Bruneton J. (1993) *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales* (No. 581.634 B7)
- Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* **94**: 223-253
- Čančarević A., Bugarski B., Šavikin K., Zdunić G. (2013) Biološka aktivnost vrsta *Thymus vulgaris* i *Thymus serpyllum* i njihovo korišćenje u etnomedicini. *Institut Za Proučavanje Lekovitog Bilja" Dr. Josif Pančić* **33**: 3-17
- Dambolena J. S., Zygadlo J. A., Rubinstein H. R. (2011) Antifumonisin activity of natural phenolic compounds: a structure–property–activity relationship study. *International journal of food microbiology* **145.1**: 140-146
- Gomes L. C., Di Benedetto G. Scorrano L. (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology* **13.5**: 589-598
- Haddouchi F., Chaouche T. M., Zaouali Y., Ksouri R., Attou A., & Benmansour A. (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chemistry* **141.1**: 253-258
- Hanamanthagouda M. S., Kakkalameeli S. B., Naik P. M., Nagella P., Seetharamareddy H. R., Murthy H. N. (2010) Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chemistry* **118.3**: 836-839
- Harris R. (2002) Progress with superficial mycoses using essential oils. *International Journal of Aromatherapy* **12**:83-91
- Holmes R. A., Boston R. S., Payne G. A. (2008) Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78.4**: 559-572
- Jabra-Rizk M.A., Forrest G.N., Mankes K., Weekes E., Johnson J.K., Lincalis D.P. (2006) Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridisation-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *Journal of Clinical Microbiology* **44.9**: 3381–3383
- Kalodera Z., Blažević N., Salopek N., Jurišić R. (1998) Eterična ulja (Aetherolea), *Farmaceutski glasnik* str. 195-210

- Karampoula E., Panhofer H. (2018) The circle in dance movement therapy: A literature review. *The arts in psychotherapy* **58**: 27-32
- King I. F. G., Francis N. J., Kingston R. E. (2002) Native and recombinant polycomb group complexes establish a selective block to template accessibility to repress transcription in vitro. *Molecular and cellular biology* **22.22**: 7919-7928
- Kolak I., Šatović Z. (2003) Lavanda u krajobrazu. *Sjemenarstvo* **20.1-2**: 47-54
- Koohsari H., Ghaemi E. A., Shesh Poli M.S., Sadegh A. (2013) Evaluation of antibacterial activity of Lemon verbena (*Lippiacitriodora*) leaves. *Annals of Biological Research* **4.10**: 52-55
- Kuštrak D. (2005) Farmakognozija fitofarmacija. Golden marketing- Tehnička knjiga, Zagreb, str. 343-345
- Lambert M. J. (2001) Psychotherapy outcome and quality improvement: Introduction to the special section on patient-focused research. *Journal of consulting and clinical psychology* **69.2**: 147
- Marković S. (2005) Fitoaromaterapija, Centar Cedrus, Zagreb
- Morcia C., Malnati M., Terzi V. (2012) In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1, 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants: Part A* **29.3**: 415-422
- Nandanie C. W., Sakaguchi M. (1993) Combined effects of cloves with potassium sorbate and sodium benzoate on the growth and biogenic amine production of *Enterobacter aerogenes*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **57.4**: 678-679
- Oral N., Vatansever L., Guven A., Gulmez M. (2008) Antibacterial Activity of Some Turkish Plant Hydrosols. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* **14.2**: 205-209
- Palfi M., Konjevod, P., Vrandečić K., Čosić J. (2018) Antifungalna aktivnost eteričnih ulja i njihovih glavnih komponenti na rast micelija *Colletotrichum coccodes*. *Poljoprivreda* **24.2**: 20-26
- Paolini J., Leandri C., Desjobert J. M., Barboni T., Costa J. (2008) Comparison of liquid-liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatile fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species. *Journal of Chromatography A* **1193.1-2**: 37-49
- Saddi M., Sanna A., Cottiglia F., Chisu L., Casu L., Bonsignore L., De Logu A. (2007) Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in vero cells – research. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **6**:10
- Samapundo S., De Meulenaer B., Osei-Nimoh D., Lamboni Y., Debevere J., Devlieghere F. (2007) Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiology* **24.5**: 465-473
- Schorr S. M. (2004) Bioresonance and phytotherapeutic hydrosols in healing. *Bioponic Phytoceuticals* **20**
- Skroza D. (2015) Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveatrola u binarnim fenolnim smjesama (Doctoral dissertation, University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology)

- Śmigielski K.B., Prusinowska R., Krosowiak K., Sikora M. (2013) Comparison of qualitative and quantitative chemical composition of hydrolate and essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*). *The Journal of Essential Oil Research* **25.4**: 291-299
- Sonboli A., Babakhani B., Mehrabian A.R. (2004) Antimicrobial Activity of Six Constituents of Essential Oil from *Salvia*. *Zeitschrift für Naturforschung C* **61.3-4**: 160-164
- Tiwari V.M., Wahr J., Swenson S. (2009) Dwindling groundwater resources in northern India, from satellite gravity observations. *Geophysical Research Letters* **36**:18
- Ultee A., Gorris L. M. G., Smid E. J. (1999) Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of applied microbiology* **85**: 211-218
- Wojcik-Stopczynska B. , Jakowienko P. , Wysocka G. (2012) The estimation of antifungal activity of essential oil and hydrosol obtained from wrinkled-leaf mint (*Mentha crispa L.*). *Herba Polonica* **58**:1

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Laura Miletić

ime i prezime studenta
