

Biološka aktivnost eteričnog ulja, hidrolata i biljnog ekstrakta odabranog samoniklog ljekovitog bilja i mogućnost primjene u prehrambenoj industriji

Šimac, Andrea

Master's thesis / Diplomski 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:159:953847>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

Andrea Šimac

1289/USH

**BIOLOŠKA AKTIVNOST
ETERIČNOG ULJA, HIDROLATA
I EKSTRAKTA ODABRANOG
SAMONIKLOG LJEKOVITOG
BILJA I MOGUĆNOST PRIMJENE
U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maje Dent.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša“ (HRZZ InteractOomyc, UIP-2017-05-6267) Hrvatske zaklade za znanost HRZZ (2018.-2023.).



ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Maji Dent na strpljivom i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog diplomskog rada. Iskreno mi je drago što sam imala priliku surađivati s

Vama kako na završnom tako i na diplomskom radu.

Želim se zahvaliti svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tijekom studija te svojim prijateljima koji su ovo studiranje učinili zanimljivijim i ljepšim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno- biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

BIOLOŠKA AKTIVNOST ETERIČNOG ULJA, HIDROLATA I BILJNOG EKSTRAKTA ODABRANOG SAMONIKLOG LJEKOVITOG BILJA I MOGUĆNOST PRIMJENE U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Andrea Šimac, 1289/USH

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti postupke ekstrakcije i predtretmane koji prethode ekstrakciji eteričnih ulja samoniklog ljekovitog bilja porodice Lamiaceae (*Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Lavandula*, *Salvia officinalis*) i Lauraceae (*Laurus nobilis*) na temelju dostupne literature. Kod proizvodnje eteričnog ulja zaostaju nusprodukti kao što su hidrolat, vodeni i biljni ostatak. Eterično ulje i navedeni nusprodukti zbog svog kemijskog sastava predstavljaju vrijedan izvor biološki aktivnih spojeva koji pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Eterična ulja i hidrolati sadrže visoke udjele monoterpena, dok vodeni i biljni ostatak polifenole. Primjena eteričnih ulja, hidrolata i biljnog ekstrakta ovih biljaka u prehrambenoj industriji je označena kao sigurna za korištenje, te je istražena njihova potencijalna primjena u prehrambenoj industriji kao prirodnog konzervansa. Također, istražena je njihova primjena u proizvodnji jestivih filmova i premaza kao i načini kvalitete eteričnih ulja i mogućih patvorenja.

Ključne riječi: *ljekovito bilje, ekstrakcija, eterična ulja, biljni ekstrakt, hidrolat*

Rad sadrži: 66 stranica, 8 slika, 6 tablica, 110 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Doc. dr. sc. *Maja Dent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. *Maja Repajić*
2. Doc. dr. sc. *Maja Dent*
3. Izv. prof. dr. sc. *Tomislav Bosiljkov*
4. Doc. dr. sc. *Tomislav Vladušić* (zamjena)

Datum obrane: 14. prosinca, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL, HYDROLATES AND EXTRACT OF SELECTED WILD MEDICAL PLANTS AND POSSIBILITY OF APPLICATION IN THE FOOD INDUSTRY

Andrea Šimac, 1289/USH

Abstract: The aim of this study was to investigate the extraction methods and pretreatments that precede the extraction of essential oils of wild medical plants of the family Lamiaceae (*Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Lavandula*, *Salvia officinalis*) and Lauraceae (*Laurus nobilis*) based on available literature. In the production of essential oil, by-products such as hydrolate, aqueous and plant residues are left behind. Due to its chemical composition, the essential oil and the mentioned by-products represent a valuable source of biologically active compounds that have a positive effect on human health. Essential oils and hydrolates contain high amounts of monoterpenes, while aqueous and plant residues contain polyphenols. The use of essential oils, hydrolates and plant extracts of these plants in the food industry is marked as safe for use, so their potential application in the food industry as a natural preservative has been investigated. Also, their use in the production of edible films and coatings and ways to control essential oils quality as well as and possible forgeries have been explored.

Keywords: *medical plants, extraction, essential oil, plant extract, hydrolates*

Thesis contains: 66 pages, 8 figures, 6 tables, 110 references,

Original in: Croatian Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Maja Dent, Assistant Professor*

Reviewers:

1. PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor
2. PhD. *Maja Dent*, Assistant professor
3. PhD. *Tomislav Bosiljkov*, Associate professor
4. PhD. *Tomislav Vladušić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: December 14th, 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LJEKOVITO BILJE.....	2
2.2. METODE UZGOJA LJEKOVITOG BILJA	3
2.3. MORFOLOŠKA OBILJEŽJA BILJAKA	7
2.3.1. Porodica Lamiaceae	7
2.3.2. Porodica Lauraceae.....	13
2.4. ETERIČNA ULJA	14
2.5. POSTUPCI DOBIVANJA ETERIČNIH ULJA	14
2.5.1. Konvencionalne metode ekstrakcije.....	15
2.5.2. Nekonvencionalne metode ekstrakcije	17
2.6. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNOG ULJA.....	25
2.6.1. Terpeni	25
2.6.2. Fenilpropanoidi.....	27
2.7. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI U ETERIČNIM ULJIMA	28
2.7.1 Eterično ulje kadulje	28
2.7.1. Eterično ulje ružmarina	30
2.7.2. Eterično ulje lavande.....	31
2.7.3. Eterično ulje timijana	32
2.7.4. Eterično ulje majčine dušice.....	34
2.7.5. Eterično ulje lovora.....	35
2.8. NUSPRODUKTI PROIZVODNJE ETERIČNIH ULJA.....	37
2.8.1. Hidrolati	37
2.8.2. Biljni ostatak.....	39
2.8.3. Vodeni ostatak	41
2.9. TOKSIČNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA	42
3. POTENCIJALNA PRIMJENA ETERIČNIH ULJA, BILJNOG EKSTRAKTA I HIDROLATA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI	43
3.1. Antimikrobni učinci eteričnih ulja	44
3.2. Upotreba biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji	46
3.3. Upotreba eteričnih ulja u izradi jestivih ambalaža	47
3.4. Antimikrobna svojstva hidrolata.....	49
4. KONTROLA KVALITETE ETERIČNIH ULJA	50
4.1. Analiza eteričnih ulja	51

5. ZAKONSKA REGULATIVA ETERIČNIH ULJA.....	52
6. ZAKLJUČAK.....	53
7. LITERATURA.....	55

1. UVOD

Biljke porodice Lamiaceae (kadulja, ružmarin, lavanda, timijan, majčina dušica i dr.) i Lauraceae (lovor) ali i mnoge druge biljke zbog svog kemijskog sastava i visokog udjela biološki aktivnih spojeva postale su glavne sirovine za proizvodnju eteričnih ulja. Eterična ulja su prirodno prisutne, hlapljive tvari koje nalazimo u različitim vrstama samoniklog ljekovitog bilja. Dobivamo ih iz različitih dijelova biljke poput: cvjetova, pupoljaka, stabljika, lišća, sjemenki, kore te plodova. Poznati su zbog svog antibakterijskog, antivirusnog, antifungalnog, antiparazitskog te insekticidnog učinka. Najčešći način dobivanja eteričnih ulja iz samoniklog bilja je vodenom destilacijom njihovih listova. Međutim, u posljednjih se nekoliko godina intenzivno istražuju tehnike ekstrakcije koje će rezultirati kraćim trajanjem postupka ekstrakcije, smanjenom potrebom za upotrebom organskih otapala za ekstrakciju, smanjenjem troškova pripreme uzoraka te većom kvalitetom i kvantitetom ekstrahiranih tvari. Također, sve se više istražuju postupci predtretmana biljke neposredno prije vodene destilacije u svrhu povećanja prinosa eteričnog ulja. Eterična ulja, ali i hidrolati te vodeni i biljni ostatak kao nusprodukti ekstrakcije samoniklog ljekovitog bilja zbog svog kemijskog sastava predstavljaju važan izvor biološki aktivnih komponenti. Zbog toga svoju primjenu pronalaze u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervansi, te u proizvodnji jestivih filmova i premaza, ali i u drugim granama industrije. Eterično ulje samoniklog ljekovitog bilja je visokokvalitetno te na tržištu postiže visoke cijene, pa je pojava patvorenja eteričnih ulja sve veća. Zato se u kontroli kvalitete eteričnih ulja koriste se različite metode ispitivanja svojstava i kemijskog sastava ulja.

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti postupke ekstrakcije i predtretmane koji prethode izolaciji eteričnih ulja samoniklog ljekovitog bilja porodice Lamiaceae (*Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Lavandula*, *Salvia officinalis*) i Lauraceae (*Laurus nobilis*) Eterična ulja i hidrolati zbog visokih udjela monoterpena, a vodeni i biljni ostatak zbog prisutnih polifenola predstavljaju vrijedan izvor biološki aktivnih spojeva te imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji. Istražena je njihova potencijalna primjena u prehrambenoj industriji kao prirodnih konzervansa, te primjena u proizvodnji jestivih filmova i premaza kao i načini kontrole eteričnih ulja i mogućih patvorenja. Diplomski rad izrađen je pregledom dostupne literature.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LJEKOVITO BILJE

Veliki broj dobro poznatih ljekovitih biljka pripada porodicama Lauraceae i Lamiaceae. Neke od njih kao što su kadulja, ružmarin, timijan, majčina dušica, lavanda i lovor od davnina se koriste kao začini, ali i u narodnoj medicini. Navedene biljne vrste se zbog svog pozitivnog biološkog učinka na ljudsko zdravlje koriste u obliku različitih proizvoda. Stoga je na tržištu prisutan sve veći broj preparata na prirodnoj biljnoj bazi, od koji se najviše proizvode čajevi, melemi i eterična ulja (Žilić, 2014).

Kako bi se dobili navedeni biljni preparati ljekovito bilje se sve više uzgaja ekološki na plantažama, no značajan dio ljekovitih biljaka dolazi i iz prirode te se divlje samoniklo ljekovito bilje smatra najkvalitetnijim i najtraženijim. Upotreba samonikloga bilja u proizvodnji eteričnih ulja i drugih biljnih preparata godinama je bilo zapostavljeno. No, danas samoniklom bilju prijete opasnost od prekomjernog branja pa je zbog toga neke biljne vrste zabranjeno brati ili je potrebno ishoditi posebnu dozvolu za branje. Kako bi se spriječilo prekomjerno iskorištavanje samoniklog ljekovitog bilja, nužno je poštivati pravila o sakupljanju kako bi se spriječila sustavna eksploatacija i sačuvala biljna staništa (Žilić, 2014).

2.2. METODE UZGOJA LJEKOVITOG BILJA

Kvaliteta ljekovitog bilja te količina biološki aktivnih komponenti u konačnim proizvodima u velikoj mjeri ovisit će i o metodi uzgoja biljaka. Razlikujemo nekoliko metoda uzgoja ljekovitoga bilja: konvencionalni uzgoj, biološki uzgoj, divlji rast (samoniklo bilje), certificirani biološki divlji rast te biodinamički uzgoj.

2.2.1. Konvencionalni uzgoj

Konvencionalni uzgoj općenito se temelji se na uzgoju samo jedne vrste te je dozvoljena upotreba umjetnih gnojiva, pesticida i herbicida. Iako ovakav način uzgoja daje najviše prinose po jedinici obradive površine, konvencionalni uzgoj troši velike količine prirodnih resursa i energije, a čest je slučaj i nekontroliranog korištenja različitih kemikalija za zaštitu i rast bilja. U konačnici, biljke dobivene konvencionalnim uzgojem ostvaruju puno manju otkupnu cijenu i lošije su kvalitete u odnosu na biljke iz ekološkog uzgoja (Marković, 2005).

2.2.2. Ekološki uzgoj

Ekološka proizvodnja u uzgoju bilja i proizvodnji biljnih proizvoda temelji se na nekoliko načela kao što su:

- očuvanje biološke i krajobrazne raznolikosti, posebice stabilnosti prirodnih staništa i očuvanju samoniklih biljnih vrsta
- usklađivanju i pravilnom gospodarenju glede izbora usjeva, biljnih vrsta i sorti, višegodišnjih plodoreda, odabira načina obrade tla, gnojidbe i zaštite te jačanja otpornosti na štetočine,
- brizi za pravilnu njegu tla; čuvanju i povećanju njegove plodnosti i biološke aktivnosti, sadržaja organskih tvari i hraniva, poboljšanju strukture tla te postupcima njegove zaštite od raznih oblika degradacije,
- zaštiti korisnih organizama: oprašivača, predatora, ptica i drugih,
- ekološki opravdanoj preradi i uporabi (recikliranju) otpada iz proizvodnje,
- proizvodnji koja isključuje ili samo iznimno dopušta uporabu agrokemikalija (mineralnih gnojiva i raznih kemijskih sredstava za zaštitu bilja) (Pravilnik, 2001).

Kako bi ljekovito bilje bilo priznato kao ekološki proizvod, proizvođač mora posjedovati certifikat o ekološkoj proizvodnji. Certifikat jamči da je cijela proizvodnja bilja od uzgoja, skladištenja, transporta, distribucije i označavanja bila nadzirana od strane nezavisnih kontrolnih tijela. Nezavisna kontrolna tijela ovlaštena su od strane Ministarstva poljoprivrede (Mešić i sur., 2016).

2.2.3. Divlji samonikli rast

Ljekovito samoniklo bilje koje se sakuplja za proizvodnju različitih biljnih preparata iznimne je kvalitete jer biljka raste u svom prirodnom staništu. Pri branju bilja iznimno je važno odabrati mjesta branja koja su udaljena potencijalnih zagađivača okoliša kao što su prometnice i tvornice. Također, kod branja bilja važna je i educiranost berača i njegovo odgovorno ponašanje pri sakupljanju (Žilić, 2014). Sakupljanje samoniklog bilja definirano je Pravilnikom o sakupljanju zavičajnih divljih vrsta. Pravilnik donosi popis zavičajnih divljih vrsta za čije je komercijalno sakupljanje iz prirode potrebno ishoditi dopuštenje, propisuje opće mjere upravljanja i zaštite tih vrsta i skupina vrsta, detaljnije definira sadržaj zahtjeva za ishođenje dopuštenja za njihovo komercijalno korištenje (Pravilnik, 2017).

2.2.4. Certificirani biološki divlji rast

Certificirani biološki divlji rast smatra se najboljom metodom uzgoja ljekovitog bilja, koji će rezultirati najsigurnijim i najkvalitetnijim proizvodima. U odnosu na divlji rast, kod ovakvog tipa rasta područje na kojem biljke rastu pod nadzorom je nezavisnog kontrolnog tijela. Kao dokaz o podrijetlu biljke i načinu uzgoja izdaje se eko-certifikat. Iz tog razloga smatra se da biljke iz certificiranog biološkog uzgoja mogu ostvariti puni terapijski potencijal (Anonymus 1, 2019).

2.2.5. Biodinamički uzgoj

Biodinamički uzgoj jedna je od grana ekološke poljoprivrede koja se temelji na poštivanju životnih zakonitosti kako bi se u skladu s prirodom ostvarili optimalni uvjeti da biljke iz zemlje i zraka upiju maksimalnu količinu tvari i energije potrebnih za rast i razvoj (Pokos Nemeč, 2011). Biodinamički uzgoj temelji se na upotrebi organskih uzgojnih metoda kao što su upotreba plodoreda, zelene gnojidbe, komposta te dinamičkih metoda kao što su specijalni

fermentirani pripravci te uzgoj bilja prema mjesečevom kalendaru. Biljke dobivene ovim načinom uzgoja dobivaju oznaku „Demeter“ koja kupcima jamči da su pri uzgoju korištena samo prirodna sredstva te biodinamički pripravci koji su dopušteni prema smjernicama o biodinamičkom uzgoju (Znaor, 1996).

2.3. ODRŽIVO KORIŠTENJE SAMONIKLOG BILJA

Održivo korištenje zavičajnih divljih vrsti regulirano je Zakonom o zaštiti prirode (NN, 80/13, 15/18, 14/19, 127/19) i Pravilnikom o sakupljanju zavičajnih biljnih vrsta (NN, 144/2017). Pravilnik donosi popis zavičajnih divljih vrsta za čije je komercijalno sakupljanje potrebno ishoditi dopuštenje, propisuje opće mjere upravljanja i zaštite vrsta i skupina vrsta, detaljnije definira sadržaj zahtjeva za ishođenje dopuštenja za komercijalno korištenje predmetnih zavičajnih divljih vrsta, kao i uvjete ishođenja dopuštenja. Osim Pravilnika postoji još i Stručna podloga za sakupljanje zavičajnih divljih vrsta koju je izradila Hrvatska agencija za okoliš i prirodu (HAOP). Ona propisuje posebne mjere sakupljanja koje uključuju godišnje količine ili vremensko razdoblje sakupljanja pojedine vrste, a Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja je tijelo koje odobrava zahtjeve za komercijalnom upotrebom (Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, 2020).

Opće mjere upravljanja i zaštite biljaka i njihovih staništa koje su propisane Pravilnikom i moraju se primjenjivati prilikom sakupljanja su:

- na jednom nalazištu nije dopušteno sakupiti više od dvije trećine jedinki pojedine biljne vrste
- pri sakupljanju nadzemnih dijelova biljaka mora se koristiti isključivo tehnika rezanja, bez oštećivanja ostalih dijelova biljke
- podzemni dijelovi biljaka smiju se sakupljati tek nakon završene faze cvjetanja, stvaranja sjemenki i/ili plodova i njihovog rasprostranjivanja
- pri sakupljanju podzemnih dijelova biljaka najmanje 80 % pojedine biljne vrste na jednom nalazištu mora se ostaviti nedirnuto
- jame nastale vađenjem podzemnih dijelova samoniklih biljaka potrebno je ponovno zatrpati pri sakupljanju biljaka nije dopušteno oštećivati njihovo stanište

Pravilnikom se definira sakupljanje zavičajnih divljih vrsta za osobne potrebe i potrebe vlastitog domaćinstva, gdje se primjercima, dijelovima ili proizvodima dobivenim od njih ne trguje ili prometuje. Za takvo sakupljanje nije potrebno ishoditi dopuštenje Ministarstva. Sakupljanjem biljaka za osobne potrebe smatra se sakupljanje u sljedećim količinama:

- do ukupno 5 pojedinačnih komada podzemnih dijelova (lukovica, gomolja, korijena ili rizoma) biljaka dnevno
- do ukupno 2 kg stabljika biljaka s listovima i cvjetovima dnevno
- do ukupno 5 stručaka (obuhvat palca i kažiprsta) stabljika biljaka s listovima i/ili cvjetovima dnevno
- do ukupno 1 kg listova biljaka dnevno
- do ukupno 1 kg cvjetova biljaka dnevno
- do ukupno 0,5 kg sjemena biljaka dnevno
- do ukupno 10 kg plodova biljaka dnevno
- do ukupno 0,5 kg pupova biljaka dnevno
- 1 busen mahovine dnevno (Pravilnik, 2017).

2.3. MORFOLOŠKA OBILJEŽJA BILJAKA

2.3.1. Porodica Lamiaceae

Porodica Lamiaceae ubraja se u jednu od porodica koje imaju najveći broj vrsta koje u žlijezdama stvaraju eterično ulje. Biljke iz porodice Lamiaceae rasprostranjene su po cijelomu svijetu, a obuhvaćaju više od 210 rodova unutar koji je oko 3500 biljnih vrsta (Hulina, 2011). Većina biljaka koja se ubraja u porodicu Lamiaceae je zeljasta, a rjeđe grmolika. Najznačajniji rodovi koji se koriste za dobivanje eteričnog ulja su: miloduh (*Hyssopus officinalis*), brojne vrste lavandi (*Lavandula angustifolia*, *Lavandula spica*, *Lavandula stoechas*) i lavandina (*Lavandula x hybrida*; najčešće abrialis, super, gross, Reydovan), matičnjak (*Melissa officinalis*), paprena metvica (*Mentha piperita*), limun metvica (*Mentha x citrata*), dugolisna metvica (*Mentha longifolia*), bosiljak (*Ocimum basilicum*), ružmarin (*Rosmarinus officinalis*), ljekovita kadulja (*Salvia officinalis*), muškantna kadulja (*Salvia sclarea*), primorski vrisak (*Satureja montana*), majčina dušica (*Thymus serpyllum*), timijan (*Thymus vulgaris*) (Marković, 2005).

2.3.1.1. Kadulja

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) je trajni, zbijeni i dlakavi mediteranski polugrm sivkasto zelene boje i ugodnog aromatičnog mirisa koji naraste do 70 cm visine. Iz jakog drvenastog smeđeg korijena raste više okruglih, razgranjenih, u donjem dijelu većinom polegnutih i odrvenjelih stabljika. Listovi su nasuprotni, 3-8 cm dugi i 1-4 cm široki, duguljasto jajasti ili usko eliptični, čvrsti i dlakavi, s peteljkom koja može biti 1-5 cm duga. Iz pazušaca listova obično rastu kratki izdanci. Ljubičasti usnati cvjetovi smješteni su pri vrhu stabljike i ogranka u obliku pršljenastih skupina, koje čine prividne klasove. Biljka cvate od svibnja do srpnja. Kadulja je biljka našeg primorja i krša. Raste uz čitavu jadransku obalu, na kamenjaru i oskudnom tlu. Postoje mnogi podaci o upotrebi kadulje kao začinske i ljekovite biljke od najstarijih civilizacija do danas. Više nego u prehrani iskorištava se u ljekovite svrhe i za dobivanje eteričnog ulja. Osušeni list sadrži oko 1,5 % eteričnog ulja, dosta treslovina i nešto gorkih tvari (Grlić, 1990).



Slika 1. Prikaz samoniklog divljeg rasta ljekovite kadulje (Anonymus 2, 2017)

2.3.1.2. Ružmarin

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je zimzeleni grm iz porodice usnača (Lamiaceae). Grane su drvenaste, uspravne i mogu narasti do 2 m visine. Za listove je karakteristično da su duguljasti i uski, dugi 1-2,5 cm, širine 1-3 mm, uvrnuta ruba te kožasti. Lice lista je tamnozeleno i glatko dok je naličje žljezdasto, tamnozeleno do sivkaste boje (Begum i sur., 2013). Cvjetovi su svijetloplavi, rastu pršljenasto smješteni na malim peteljcima u pazušcima gornjih listova. Prašnika su dva i vire iz cvijeta. Cvate najviše u proljeće, te sredinom jeseni. Plod je kalavac koji se dijeli (kala) na dva smeđa oraščića. Cijela biljka je aromatičnog mirisa (Grlić, 1990).

Prirodno raste na sunčanim i kamenitim područjima priobalnog područja Sredozemnog mora, no često se sadi po vrtovima kao ljekovita začinska biljka. Ružmarin je česta vrsta u znanstvenim istraživanjima zbog svog vrijednog eteričnog ulja te drugih biološki aktivnih komponenti koje su prisutne u gotovo svim dijelovima biljke (Ribeiro-Santos i sur., 2015; Ainane i sur., 2019). Zbog sve veće primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, eterično ulje *R. officinalis* ima visoku komercijalnu važnost. To je bezbojna ili blijedo žuta tekućina, intenzivne arome. Eterično ulje predstavlja oko 1-2,5 % ukupne mase biljke, a njegov se kemijski sastav, poput ostalih eteričnih ulja, razlikuje u skladu sa zemljopisnim područjem na kojem se sakuplja biljka, klimi, dijelu biljke koja se koristi te metodi ekstrakcije (Borges i sur., 2019).



Slika 2. Prikaz listova i cvjetova nadzemnog dijela biljke *Rosmarinus officinalis* L.

(Anonymus 3, 2015)

2.3.1.3. *Lavanda*

Lavanda (*Lavandula*) je zimzeleni mirisni polugrm iz porodice usnača (*Lamiaceae*). Stabljika naraste do 60 cm visine, pri dnu je drvenasta i ovisno o vrsti može biti jače razgranata. Listovi su tanki i uski, sivo zelene boje, linearni i cjelovita ruba. Uspravni, svijetloljubičasti cvjetovi smješteni su na vrhovima u klas. Izraženog su i ugodnog mirisa. Cvatu u razdoblju od lipnja do kolovoza u trajanju oko 30-ak dana. Iz Francuske je u 18. stoljeću donesena na Hvar te se zatim raširila na okolna mjesta. Danas se smatra domaćom biljkom no, postoji puno njenih vrsta i varijeteta. Razmnožava se sjetvom sjemena u proljeće ili uzimanjem poluzelenih reznica u ljeto. Traži toplo i sunčano mjesto. Smatra se jednom od najmedonosnijih biljaka kod nas (Šimić, 1980).



Slika 3. Prikaz divljeg rasta lavande (Anonymus 4, 2020)

2.3.1.4. Timijan

Timijan (*Thymus vulgaris* L.) je trajna biljka iz porodice usnača (Lamiaceae). Stabljika je razgranata, grmolikog rasta, odrvenjela u donjem dijelu i naraste 40 cm visine, te nešto više u širinu. Listovi su mali, nalaze se na kratkoj peteljci, ovalni su, na licu sivkasto zeleni, naličje im je bjelkasto. Cvjetovi su mali, blijedo ružičasti, skupljeni u pršljenove. Rasprostranjen je u jugozapadnoj i južnoj Europi. Raste na sunčanim, toplim i suhim mjestima u nizinskom i brdskom području. Zaštićena je biljka. Uzgaja se kao vrtna biljka bilo radi ljekovitosti ili ukrasa. Timijan je vrlo aromatičan, koristi se kao začinsko bilje. Kao ljekovita biljka koristan je kod probavnih tegoba, kao pomoć za tretiranje kašlja, kod infekcija usne šupljine i infekcija dišnog sustava. Od cijele biljke u cvatu se proizvodi eterično ulje koje osim timola sadrži i karvakrol, cimen, linalool, pinen i druge terpenske spojeve. Ovisno o njegovom kemotipu određuje se njegova primjena (Grlić, 1990).



Slika 4. Prikaz grma i cvijetova biljke *Thymus vulgaris* L. (Anonymus 5, 2020)

2.3.1.5. Majčina dušica

Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) je trajni puzeći grm iz porodice usnača (Lamiaceae). Grančice su mu uspravne, nagnute ili se uzdižu. Listovi su nasuprotni i unakrsni, sitni, svega oko 0,5- 1,5 cm dugi, čitava ruba, goli ili obrasli dlakama. Sitni svijetloružičasti cvjetovi stoje u zbijenim okruglastim cvatovima na vrhovima ogranaka. Biljka ima, naročito u vrijeme cvatnje, ugodan, aromatičan miris i okus. Najčešće raste po suhim i sunčanim mjestima, na livadama, pašnjacima i na kamenju, uz rubove šuma i puteva. Poznat je veliki broj samoniklih oblika ove aromatične biljke. Botanički naziv *Thymus serpyllum* zapravo je skupno ime za različite oblike i vrste. Biljka u svježem ili osušenom može služiti kao začim, a nadzemni dio se tijekom cijele godine može služiti za pripremanje aromatičnih čajeva i napitaka. U biljci je prisutno oko 40-50 mg vitamina C. Isto tako biljka se može koristiti za dobivanje visoko cijenjenog eteričnog ulja, čiji je glavni sastojak timol (Grlić, 1990).



Slika 5. Prikaz biljke *Thymus serpyllum* L. (Anonymus 6, 2018)

2.3.2. Porodica Lauraceae

Porodica Lauraceae sastoji se od 30 rodova u koje se ubraja oko 2500 vrsta. Uglavnom ih čine drvenaste biljke koje rastu tropskim i suptropskim krajevima kao što su Azija i Amerika. Rasprostranjena je i po Europi i sjevernoj Africi na područjima oko Mediterana. Eterična ulja kod ove porodice nalazimo u različitim dijelovima biljke kao što su list (lovor), kora i grančice (cimet), drvo (ružino drvo) i plodovi (licea). Najznačajniji rodovi porodice Lauraceae su ruža drvo (*Aniba rosaedora*), kamforovac (*Cinnamomum camphora*), pravi cimetovac (*Cinnamomum verum*), lovor (*Laurus nobilis*), licea (*Litsea citrata*), ravensara (*Ravensara aromatica*), sasafra (*Sassafras album*) (Marković, 2005).

2.3.2.1. Lovor

Lovor (*Laurus nobilis* L.) je višegodišnji, vazdazeleni mediteranski grm ili srednje visoko stablo (10-15 m) s prsnim promjerom debla do 60 cm. U mladosti je kora debela, glatka i siva, a kasnije hrapava i crna. Listovi su zavojito raspoređeni, naizmjenični, na kratkoj peteljci, jednostavni, bez palistića, eliptični do duguljasti, šiljata ili ušiljena vrha, cijela i često valovita ruba, dugi 7-12 cm, široki 2,5-4,5 cm, korasti, s gornje strani tamnozeleni i sjajni, s donje strane zeleni bez sjaja, goli i vrlo aromatični. Listovi su jednostavni, izmjenično poredani, aromatični zbog prisutnih žlijezda s eteričnim uljem. Plod je jednosjemena, kuglasta bobica promjera 1-1,5 cm koja dozrijeva u kasnu jesen (Grdinić i Kremer, 2009).



Slika 6. Prikaz biljke *Laurus nobilis* L. (Anonymus 7, 2017).

2.4. ETERIČNA ULJA

Eterična ulja (eng. *essential oils*) su bezbojne ili žućkaste tekućine, koje sadrže aromatične i hlapljive spojeve. Biljka ih može sintetizirati u svim svojim dijelovima, a najčešće se dobivaju iz cvjetova, listova i plodova, a rjeđe iz kore i korijena. Obično se pohranjuju u sekretorne ili epidermalne stanice te u žlijezde. S obzirom na to da u svom sastavu sadrže aromatične, hlapljive spojeve, eterična ulja su iznimno cijenjena zbog svog ugodnog mirisa i ljekovitosti. Do danas je identificirano 3000 različitih eteričnih ulja, a oko 300 vrsta eteričnih ulja je u komercijalnoj upotrebi (Bhuaniramy i sur., 2019). Sastav i kvaliteta eteričnog ulja ovisi o starosti i podvrsti biljke, organu biljke koji sintetizira ulje, uvjetima okoliša (klima, tlo, vegetacija) te metodi kojom se provodi ekstrakcija. Svoju primjenu do danas su pronašla u brojnim industrijama, pa se tako upotrebljavaju u proizvodnji lijekova, parfema i kozmetičkih proizvoda te kao konzervansi u proizvodnji hrane (Bhuaniramy i sur., 2019).

2.5. POSTUPCI DOBIVANJA ETERIČNIH ULJA

Eterična ulja su mali dio biljnog sustava, ali iznimno cijenjena i važna. Eterična ulja daju karakteristična svojstva aromatičnim ljekovitim biljkama koja se zbog svojih svojstava koriste u farmaceutskoj, prehrambenoj te kozmetičkoj industriji. Imaju složen i promjenljiv sastav, a njihova aroma rezultat je kombinacije aroma svakog kemijskog spoja koji se nalazi u sastavu. Kako bi se tijekom ekstrakcije eteričnih ulja održao prirodni udio sastojaka, važno je odabrati adekvatnu metodu ekstrakcije. Ekstrakciju eteričnih ulja možemo definirati kao proces izolacije kemijskih spojeva iz ljekovitog bilja i njihovo koncentriranje. Dvije najčešće metode ekstrakcije su: vodena destilacija i tiještenje. Općenito, metode ekstrakcije biološki aktivnih komponenti iz biljnog materijala mogu se podijeliti na klasične (konvencionalne) i na suvremene (nekonvencionalne) metode. U konvencionalne metode ekstrakcije ubrajamo: vodenu destilaciju, Soxhlet ekstrakciju, maceraciju, hladno prešanje. Nekonvencionalne metode su: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija potpomognuta enzimima, ekstrakcija pomoću superkritičnih plinova, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, ubrzana ekstrakcija pri povišenom tlaku (Azmir i sur, 2013). Konvencionalne metode još uvijek su velikim dijelom zastupljene u industriji, no sve je veća potreba za prelaskom na suvremene metode, koje će biti isplative, ekološki održive i sposobne proizvoditi proizvode s istim ili poboljšanim karakteristikama (Stratakos i Koidis, 2016).

2.5.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Ekstrakcija biološki aktivnih komponenti iz biljnog materijala može se provoditi različitim klasičnim (konvencionalnim) metodama. Klasične metode zasnivaju se na svojstvima otapala koje se koristi uz dodatak topline tj. zagrijavanje i/ili miješanje. Najčešće konvencionalne metode koje se upotrebljavaju su:

- Destilacija
- Soxhlet ekstrakcija
- Maceracija
- Hladno prešanje (Azmir i sur., 2013)

2.5.1.1. Destilacija

Destilacija je jedna od najčešće korištenih metoda ekstrakcije u svijetu. Za ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz aromatičnog ljekovitog bilja najčešće se upotrebljava vodena destilacija. Zbog upotrebe vode kao otapala u literaturi se često koristi termin hidrodestilacije (Azmir i sur., 2013).

Vodena destilacija provodi se tako da se biljni materijal stavi u kotao za destilaciju te se doda određeni volumen vode. Ukoliko se biljni materijal odvoji mrežicom i ne dolazi u kontakt s vodom tada je riječ o vodeno-parnoj destilaciji. Kod parne destilacije, kotao koji se zagrijava i stvara paru u potpunosti je odvojen od dijela aparature u kojem se nalazi biljni materijal. Sam princip ekstrakcije eteričnog ulja je isti kod navedenih destilacija. Vodena para prolazi kroz biljni materijal te ekstrahira čestice ulja. Prolaskom čestica ulja i vodene pare kroz hladilo dolazi njihove kondenzacije. U posebnom dijelu aparature tzv. separatoru dolazi do odvajanja uljne faze od vodene. Eterično ulje se skuplja na površini, a voda koja se nalazi ispod njega naziva se hidrolat ili cvjetna vodica (Marković, 2005). Vodena destilacija se vrlo često provodi u aparaturi po Clavengeru sa svrhom dobivanja eteričnog ulja iz bilja (Azmir i sur., 2013).

2.5.1.2. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakciju prvi puta je opisao njemački znanstvenik Franz Ritter Von Soxhlet 1879. godine. Ova metoda u to vrijeme koristila se za ekstrakciju lipida. Danas se smatra jednom od najpristupačnijih i najviše korištenom metodom ekstrakcije visoko vrijednih prirodnih spojeva iz biljnog materijala. Ova metoda često se koristi u znanstvenim istraživanjima kao kontrolni model za usporedbu s novim nekonvencionalnim metodama ekstrakcije. Soxhlet ekstrakcija višekratna je ekstrakcija pri povišenoj temperaturi te se izvodi u Soxhletovu ekstraktoru. Kod ove metode najčešće se koriste organska otapala pa dobiveni uzorak sadrži korišteno otapalo, koje će i daljnjim metodama uklanjanja zaostajati u uzorku (Azmir i sur., 2013). Princip ove metode je da se pare otapala koje se zagrijava u tikvici, kondenziraju u hladilu. Tako topli kondenzat natapa materijal koji se ekstrahira (biljni materijal nalazi se u cilindru u posebnom tuljcu od filter-papira). Kada se otapalom napuni prostor u kojem se nalazi biljni materijal, tada se prema načelu spojenih posuda otapalo prelije u tikvicu (Rapić, 2008). Neki od glavnih nedostataka ove metode su dugo vrijeme ekstrakcije, mali prinosi te zaostajanje organskog otapala korištenog za ekstrakciju u uzorku. Iako se organsko otapalo može ukloniti iz uzorka mali dio otapala i dalje će ostati (Azmir i sur., 2013).

2.5.1.3. Maceracija

Maceracija kao metoda ekstrakcije biološki aktivnih komponenti vrlo je popularna pri nekim kućnim, domaćim izradama biljnih ekstrakata. Iako je prinos ekstrahiranih biljnih komponenti manji u odnosu na druge metode ekstrakcije, vrlo je česta metoda zbog toga što je jednostavna i relativno jeftina. Kod maceracije, kao i kod svih ekstrakcija čvrsto-tekuće bitno je samljeti materijal, kako bi se dobila što veća dodirna površina s otapalom. Također, kod maceracije je važno povremeno lagano promućkati sadržaj kako bi se koncentrirana otopina uklonila s površine i time olakšao prijenos biološki aktivnih tvari iz biljnog materijala u otapalo (Azmir i sur., 2014; Marković, 2005).

2.5.1.4. Prešanje

Proces prešanja ili tiještenja je vrlo jednostavna metoda ekstrakcije, pri čemu se biljni materijal preša da bi se oslobodio sadržaj žlijezda tj. da bi se ekstrahiralo eterično ulje. Materijal se miješa s vodom, a eterično se ulje odvaja od ostatka biljne mase metodama kao što je centrifugiranje, destilacija, filtracija. Ulje koje se dobije ovom metodom predstavlja nepromijenjen sadržaj biljnih žlijezda, za razliku od vodene destilacije kod koje je moguć nastanak nekih novih spojeva prilikom postupka ekstrakcije. Eterično ulje proizvedeno prešanjem sastoji se od hlapljivih i nehlapljivih frakcija kemijskih spojeva. Hlapljiva frakcija koja je dominantna sadrži spojeve kao što su eteri, monoterpeni i aldehidi, dok nehlapljiva frakcija sadrži flavonoide, furankumarine, masne kiseline itd. (Azmir i sur., 2013; Marković, 2005).

2.5.2. Nekonvencionalne metode ekstrakcije

Glavni nedostaci upotrebe konvencionalnih metoda ekstrakcije kao što su dulje vrijeme ekstrakcije, manji prinosi biološki aktivnih komponenti, nedovoljna selektivnost te degradacija termolabilnih komponenti te primjena organskih otapala visoke čistoće bili su glavni razlozi za razvoj novih ekstrakcijskih metoda. Kako bi se pronašla rješenja ovim problemima razvile su se suvremene metode ekstrakcije, koje se nazivaju nekonvencionalnim metodama. U nekonvencionalne metode ubrajaju se: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta enzimima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, ekstrakcija upotrebom pulsirajućeg električnog polja, ekstrakcija upotrebom superkritičnih plinova te ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku. Također, nekonvencionalne metode ekstrakcije razvijaju se u okviru koncepta „Zelene ekstrakcije“ kojoj su neki od ciljeva smanjiti potrošnju energije, upotrebljavati manje kemijski štetna otapala koja će omogućiti sigurne i kvalitetne biljne ekstrakte te biti manje štetna za okoliš (Azmir i sur., 2013). Također, neki od navedenih postupaka ekstrakcije (npr. ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta enzimima ili ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima) koriste se kao predtretmani postupcima ekstrakcije eteričnog ulja iz biljke u svrhu povećanja prinosa eteričnog ulja (Elyemni i sur., 2019; Hosni i sur., 2013; Kowalski i sur., 2009).

2.5.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvuk je posebna vrsta zvučnoga vala koji je izvan dosega ljudskoga sluha, u rasponu od 20 kHz do 100 MHz. Ultrazvučni val prolazi kroz krute, plinovite i tekuće medije i uzrokuje pojavu nazvanu kavitacija. Kavitacija uzrokuje rast, širenje i kolaps mjehurića medija koji za posljedicu ima mehanički stres i poremećaj stanica biljnog tkiva (Shahid i sur., 2016). Glavna prednost ove metoda je što omogućava lakši prijenos mase iz biljnog materijala u otapalo te lakše prodiranje otapala u biljni materijal. Mehanizam ultrazvučne ekstrakcije temelji se na: brzom difuziji kroz staničnu stijenkicu te ispiranju sadržaja stanice nakon pucanja stanične stijenke (Azmir i sur., 2013). Učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (eng. *Ultrasound assisted extraction*) ovisit će o nekoliko faktora kao što su: snaga ultrazvuka, promjer sonde, temperatura, vrijeme obrade ultrazvukom i otapalo koje se koristi (Dent i sur., 2015). Velika prednost ove metode je to što je jednostavna za korištenje, smanjuje vrijeme ekstrakcije, količinu utrošene energije i otapala. Također, omogućava i učinkovitije miješanje, brži prijenos mase iz biljnog materijala u otapalo, smanjuje količinu opreme i broj procesnih koraka (Azmir i sur., 2013).

Prednost korištenja ultrazvuka kao predtretmana, nudi neke prednosti u smislu povećanja prinosa eteričnog ulja, povećanje prinosa biološki aktivnih spojeva s antioksidativnim i antimikrobnim učincima, smanjenje toplinske razgradnje kemijskih spojeva te smanjenje vremena ekstrakcije čime ekstrakciju eteričnog ulja čini jeftinijom i ekološki prihvatljivijom (Vinatoru i sur., 2017).

Glavna prednost primjene ultrazvučne ekstrakcije je u kratkom vremenu primjene gdje se predtretmanom ultrazvukom u trajanju do 20 minuta uz postupak maceracije u proizvodnji eteričnog ulja timijana (*Thymus vulgaris* L.) postiže povećanje udjela izoliranog ulja za 9 %. Duže vrijeme ekstrakcije potpomognute ultrazvukom od 60 min nije imalo značajan utjecaj na prinos destiliranog eteričnog ulja. Kemijskom analizom eteričnog ulja kod dužeg vremena predtretmana ekstrakcije u trajanju od 120 min dolazi do smanjenja (timola za 6 %, karvakrola za do 14 %, *p*-cimena do 17 %) ili povećanja (γ -terpinena od 35 do 53 %) pojedinih kemijskih komponenti (Kowalski i sur., 2009). Miljanović i sur. (2020) također su zabilježili porast ekstrakcijskog prinosa eteričnog ulja kod vodene destilacije s ultrazvukom kao predtretmanom. Rezultati su pokazali da je došlo do 50 %-tnog povećanja prinosa kod kadulje i ružmarina te 60 %-tnog povećanja kod lovora. Rezultati istraživanja Issartier i sur. (2013) utjecaja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju eteričnog ulja lavandina (*Lavandula intermedia* var. Grosso, hibrida prave lavande *Lavanda angustifolia*) pokazali su da nije došlo do značajnog

povećanja prinosa eteričnog ulja, ali se udio glavne komponente linaloola znatno povećao s predtretmanom ultrazvukom. Jedan od glavnih razloga zašto ova metoda ekstrakcije nije u velikoj mjeri zastupljena industriji je to što je ultrazvuk još uvijek više zastupljen više na laboratorijskoj razini, a proširenje na industrijsku razinu iziskuje velika novčana ulaganja za povećavanje kapaciteta ultrazvučnih uređaja i zapremnih posuda za industrijske količine (Vinatoru i sur., 2017).

2.5.2.2. Ekstrakcija potpomognuta enzimima

Stanična stijenka biljnih stanica sastoji se od niza složenih kemijskih spojeva kao što je celuloza, hemiceluloza, pektin, lignin, pa čak i proteini. Ova struktura omogućuje biljnim stanicama otpornost na ekstrakciju unutarstaničnih komponenti te čuva sadržaj stanične citoplazme. Ekstrakcija potpomognuta enzimima temelji se na sposobnosti enzima da hidroliziraju komponente stanične stijenke te naruše strukturni integritet stanice. Zbog toga se enzimski ekstrakcija smatra novom i učinkovitom metodom ekstrakcije koja u značajnoj mjeri dovodi do povećanja ukupnog prinosa biološki aktivnih komponenti. Najčešći enzimi koji se dodaju su: celulaza, hemicelulaza, pektinaza, α -amilaza i dr. Glavni ekstrakcijski parametri su: temperatura reakcije, vrijeme ekstrakcije, pH sustava, koncentracija enzima, veličina čestica supstrata (Azmir i sur., 2013).

Ekstrakcija potpomognuta enzimima (eng. *Enzyme assisted extraction*) ima nekoliko prednosti za razliku od konvencionalnih metoda, a to su: blagi uvjeti reakcije (procesi koji se odvijaju pri niskim temperaturama i u kratkom vremenu), mogućnost korištenja cijelog biljnog materijala, manji broj procesnih koraka prilikom ekstrakcije, specifičnost supstrata koja zauzvrat dovodi do ekstrakcije velikog broja biološki aktivnih spojeva (Belwal i sur., 2018). Međutim, treba uzeti u obzir da i ekstrakcija potpomognuta enzimima može imati potencijalna ograničenja kao što su: enzimi su relativno skupi za veliku industrijsku proizvodnju, dostupni enzimi ne mogu u potpunosti hidrolizirati stijenke biljnih stanica, izlučivanje enzimom nije uvijek izvedivo u industrijskim razmjerima jer je aktivnost enzima strogo ograničena ekološkim uvjetima (Cheng i sur., 2015).

Ekstrakcija potpomognuta enzimima kao predtretman obrade biljnog materijala neposredno prije vodene destilacije se uspješno primjenjuje s ciljem povećanja prinosa ili promjene kemijskog sastava eteričnog ulja izoliranog iz ljekovitog bilja. Provedbom predtretmana kombinacijom enzima celulaza/hemicelulaza postiže se povećanje prinosa eteričnog ulja timijana (*Thymus capitatus* L.) čak do 109 %, a ružmarina (*R. officinalis*) do 20 % u odnosu na

kontrolni uzorak, te je GC-MS analizom određen viši udio do 38 % glavnog spoja karvakrola (Hosni i sur. 2013). Nešto manji prinos eteričnog ulja *R. officinalis* nego što je opaženo za *T. capitatus* sugerira da kombinacija enzima s celulazom i/ili kombinacijom enzima koji sadrže celulazu nije dovoljno učinkovita za ekstrakciju eteričnog ulja iz *R. officinalis*. Iako je došlo do povećanja prinosa eteričnog ulja ružmarina, udio glavnog kemijskog spoja eteričnog ulja, 1,8-cineola se smanjio. Ovi rezultati pokazuju razlike u učinkovitosti enzima na djelovanje ekstrakcije i odražavaju razlike u strukturi i svojstvima biljnog materijala. Razlike u morfološkom i strukturnim značajkama sekretornih žlijezda između ružmarina i timijana, mogli bi barem dijelom objasniti dobivene rezultate (Hosni i sur., 2013). Slične rezultate dobili su i Rashed i sur. (2017) koji su proveli istraživanje o utjecaju enzimskog predtretmana na količinu ekstrahiranog eteričnog ulja dobivenog vodenom destilacijom potpomognutom ultrazvukom i mikrovalovima. Ispitan je enzimski utjecaj celulaze, hemicelulaze te kombinacije dvaju enzima na strukturu žljezdanih trihoma biljnih stanica kako bi se postigao maksimalni prinos eteričnog ulja lavande. Rezultati su pokazali da se najviše eteričnog ulja dobije primjenom kombinacije dvaju enzima, zatim hemicelulaze i najlošiji prinosi dobiju se primjenom celulaze. Također, uočen je viši prinos glavnog kemijskog spoja linalool u uzorcima eteričnog ulja koji su bili tretirani s kombinacijom dvaju enzima. S druge strane, Miljanović i sur. (2020) istražili su kako enzimski predtretmani kod vodene destilacije (celulaza, pektinaza, ksilanaza) imaju tek mali utjecaj na ekstrakcijski prinos u odnosu na druge predtretmane kao što je ekstrakcija uz refluks. Djelovanje enzimskih predtretmana na količinu ekstrahiranih spojeva ovisit će o vrsti enzima, koncentraciji enzima, biljnoj vrsti, temperaturi, pH i trajanju procesa (Puri i sur., 2012). Iako postoje odstupanja u rezultatima u znanstvenim radovima, enzimski predtretman vodenoj destilaciji ima potencijal primjene s ciljem povećanja prinosa eteričnog ulja i nekih njihovih komponenti. Ekstrakcija potpomognuta enzimima obećavajuća je metoda predtretmana ekstrakcije eteričnog ulja i nekih njegovih komponenti od interesa (npr. karvakrol), a kvantitativne promjene u količini pojedinih komponenti eteričnog ulja imat će snažan utjecaj na njegovu biološku aktivnost (Hosni i sur., 2013).

2.5.2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi s frekvencijskim rasponom od 300 MHz do 300 GHz. Mikrovalovi se sastoje od dva oscilirajuća polja koja su okomita, a to su: električno i magnetsko. Kod mikrovalne ekstrakcije dolazi do dielektričnog zagrijavanja, a učinkovitost ekstrakcije ovisit će o sposobnosti biljnog materijala i otapala da apsorbira mikrovalno zračenje. Kao posljedica djelovanja mikrovalova dolazi do oštećenja vodikovih veza u biljnim stanicama i rotacije dipola (Blekić i sur., 2011). Mikrovalovi će prouzrokovati molekularno gibanje iona, ali neće doći do promjene molekularne strukture. Otapala koja posjeduju dobru dielektričnu konstantu i koja se najčešće koriste su voda, etanol i metanol. Iako se ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazala kao dobra metoda za ekstrakciju eteričnih ulja, važno je optimizirati parametre ekstrakcije (temperatura, vrijeme, snaga) kako povećanjem temperature ne bi došlo do degradacije termolabilnih komponenti eteričnog ulja (Azmir i sur., 2013).

Ekstrakcija potpomognutom mikrovalovima može se koristiti kao ekstrakcija u svrhu dobivanja eteričnog ulja ili kao predtretman obrade biljnog materijala neposredno prije vodene destilacije. Ekstrakcija eteričnog ulja mikrovalovima pokazala se učinkovitom u ekstrakciji eteričnog ulja iz aromatičnih biljni vrsta (*Thymus vulgaris* L., *Ocimum basilicum* L., *Mentha crispa* L.). Rezultati su pokazali da je ekstrakcija mikrovalovima u trajanju od 30 min, dala jednake prinose kao i vodena destilacija u trajanju od 4,5 h, dok je kemijski sastav eteričnog ulja dobivenog mikrovalnom ekstrakcijom sadržavao viši udio oksigeniranih monoterpena (Lucchesi i sur., 2004). Zbog toga se ova metoda pokazala dobar način obrade biljnog materijala prije provedbe vodene destilacije. Prednost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima je u kraćem vremenu izolacije eteričnog ulja ružmarina *Rosmarinus officinalis* L. gdje se isti prinos eteričnog ulja od $1,35 \% \pm 0,04 \%$ dobije nakon 20 minuta u odnosu na vodenu destilaciju koja traje 180 minuta (Elyemni i sur. 2019). Toplina koja se stvara mikrovalnim grijanjem uključuje djelomični gradijent tlaka hlapljivih spojeva i unutarne pregrijavanje što dovodi do bržeg i većeg narušavanja staničnih stijenki. Kao rezultat, ubrzava se postupak ekstrakcije eteričnih ulja, čime se može objasniti razlika u vremenu između dvije ekstrakcijske metode. To se može objasniti i brzinom prijenosa topline kod dviju metoda ekstrakcije. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija koristi tri načina prijenosa topline unutar uzorka: kondukcija, konvekcija i toplinsko zračenje, dok se prijenos topline kod vodene destilacije može se ostvariti samo kondukcijom i konvekcijom (Elyemni i sur., 2019).

Može se zaključiti da su eterična ulja ekstrahirana mikrovalovima su kvantitativno i kvalitativno slična onima dobivenim konvencionalnom metodom vodene destilacije, ali je vrijeme

ekstrakcije značajno smanjeno, sa 180 na 20 minuta ekstrakcije. Kemijska analiza eteričnog ulja dobivenog ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pokazala je da ono sadrži više udjele oksigeniranih spojeva u odnosu na ulja dobivena vodenom destilacijom (Moradi i sur., 2018; Karakaya i sur., 2014). Oksigeniranim spojevima se pripisuju ljekovita svojstva eteričnog ulja i mogu se koristiti kao mjera kvalitete eteričnog ulja. Razlog tomu je što oksigenirani spojevi imaju visok dipolni moment i snažnije će reagirati prilikom izlaganja mikrovalovima te se mogu lakše ekstrahirati za razliku od monoterpenskih ugljikovodika koji imaju slab dipolni moment (Kosar i sur., 2005). Kemijski sastav ulja pokazao je da su količine oksigeniranih spojeva znatno više, a količine monoterpenskih ugljikovodika niže u ružmarinovom ulju ekstrahiranom mikrovalovima u usporedbi s ružmarinovima uljem ekstrahiranom pomoću vodene destilacije. Može se zaključiti da je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima dobra alternativa za ekstrakciju eteričnog ulja ružmarina jer doprinosi znatnoj uštedi vremena ekstrakcije što ukazuje na znatnu uštedu u troškovima ekstrakcije eteričnih ulja te predstavlja „zelenu tehnologiju” za ekstrakciju eteričnih ulja (Elyemni i sur., 2019).

2.5.2.4. Ekstrakcija potpomognuta superkričnim plinovima

Ekstrakcija superkričnim plinovima rasprostranjena je metoda ekstrakcije u svijetu i privlači veliko znanstveno zanimanje. Široku primjenu našla je i u prehrambenoj tehnologiji gdje je poznata u proizvodnji beskofeinske kave. Superkrično stanje tvari postiže se njenim izlaganjem temperaturi i tlaku iznad njihove kritične točke. Kritična točka definira se kao karakteristična temperatura i tlak kod koje ne postoje karakteristike plinske i tekuće faze. Superkrični plin ima svojstva difuzije, viskoznosti i površinske napetosti plinova te gustoću tekućina. Najčešće se upotrebljava ugljikov dioksid, a njegova kritična temperatura je 31 °C i tlak od 74 bara. Jedini nedostatak je njegova mala polarnost, što ga čini idealnim za ekstrakciju nepolarnih tvari. Problem polarnosti riješen je upotrebom kemijskih modifikatora. Obično se dodatkom male količine znatno poboljša polarnost CO₂. Prednosti ove metode ekstrakcije svakako su to da: superkrične tekućine imaju veći koeficijent difuzije, nižu viskoznost i površinsku napetost što uzrokuje bolje prodiranje u matricu uzorka. Zatim, vrijeme ekstrakcije se znatno smanjuje, superkrične tekućine su selektivnije od tekućih otapala, metoda je pogodna za ekstrakciju termolabilnih kemijskih spojeva, ekstrakcija se može provesti na malim količinama uzorka pa sve do industrijskih količina (Azmir i sur., 2013). Superkrična ekstrakcija jedna je od najčešćih nekonvencionalnih metoda ekstrakcije eteričnog ulja iz

aromatičnog bilja. Ugljikov dioksid smatra se idealnim otapalom za ekstrakciju i izolaciju ulja jer je netoksičan, lako dostupan i lako se eliminira iz ekstrahiranog ulja. Pravilno postavljanje parametara ekstrakcije kao što su: temperatura, tlak, protok plina, veličina čestica materijala i frakcioniranje, imat će značajan utjecaj na prinos ekstrakcije, skratiti vrijeme i smanjiti količinu potrošene energije. U usporedbi s najčešće korištenom konvencionalnom metodom, vodenom destilacijom, ova metoda neće dovesti do hidrolize i termalne degradacije kemijskih komponenti. Također, ova metoda ostvaruje veće prinose ekstrakcije u odnosu na vodenu destilaciju (Yousefi i sur., 2019). Conde-Hernandez i sur. (2017) usporedili su ekstrakciju superkritičnim CO₂ s parnom i vodenom destilacijom svježih listova ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.). Rezultati su pokazali da su viši prinos eteričnog ulja te bolja antioksidativna svojstva ostvarena prilikom ekstrakcije superkritičnim CO₂. Antioksidativna svojstva eteričnog ulja 14 puta su bolja u odnosu na druga dva eterična ulja. GC-MS analizom identificirano je 19 kemijskih komponenti, dok je u druge dvije destilacije identificirano 17 spojeva. Dominantne komponente eteričnog ulja ružmarina u svim uljima bile se kamfor i eukaliptol, a udio kamfora u eteričnom ulju dobivenom superkritičnom ekstrakcijom znatno je povećan pa se time mogu objasniti i bolja antioksidativna svojstva eteričnog ulja. Očuvanje i ekstrakcija glavnih komponenti eteričnog ulja najveća je prednost ove metode jer mnoga svojstva, poput antimikrobnog, antioksidativnog i protuupalnog djelovanja, ovise o tim kemijskim spojevima. Zbog toga se ova metoda često koristi kako u industriji tako i u znanstvenim istraživanjima (Yousefi i sur., 2019).

2.5.2.5. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom

Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom može se uvrstiti među nove metode za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz prirodnih materijala. Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom često se koristi se kao alternativa konvencionalnim metodama zbog njihovih već spomenutih ograničenja. Također, ova metoda je ekološki prihvatljiva i ima velik potencijal u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Parametri ekstrakcije koji će utjecati na prinos ekstrahiranih biološki aktivnih spojeva su: tlak, vrijeme ekstrakcije, priroda i volumen otapala, broj ponavljanja ekstrakcijskih ciklusa (Khan i sur., 2018). Pri obradi uzorka visokim hidrostatskim tlakom primjenjuju se tlakovi od 50-1000 MPa. Vrijeme trajanja ekstrakcije kreće se od svega nekoliko sekundi pa do 30 min, pri temperaturama koje se kreću u rasponu od 5-90 °C (Bosiljkov i sur., 2010). Ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom slijedi Le Chatelierov zakon koji kaže da ako se na sustav koji je u ravnoteži primjeni neka intenzivna veličina, sustav će tu promjenu nastojati umanjiti i uspostaviti ponovnu ravnotežu tj. ako na sustav u ravnoteži djelujemo visokim tlakom doći će poticanja reakcija koje dovode do smanjenja volumena. Visoki tlak uzrokuje promjene u postojećoj strukturi molekula, djelovanjem na proteine, lipide, stanične enzime, što kao posljedicu uzrokuje oštećenje stanične stijenke i unutarnje strukture stanice. Tako se smanjuje otpor prijenosa mase iz stanice u otapalo, stoga se biološki aktivne komponente lakše ekstrahiraju. Strukturne promjene koje dovode do oštećenja stanične stijenke i organela neće dovesti i do narušavanja strukture biološki aktivnih komponentni. Zbog male veličine molekula biljnih materijala, visoki tlak ne dovodi do njihove modifikacije (Khan i sur., 2018).

Prednosti upotrebe ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom su smanjenje toplinske razgradnje termolabilnih kemijskih spojeva, ostvaruju se viši ekstrakcijski prinosi u odnosu na konvencionalne metode te smanjuje se vrijeme ekstrakcije. Posljednjih godina ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom koristi se za ekstrakciju karotenoida, fenolnih kiselina, flavonoida i antocijana iz različitih prehrambenih proizvoda, poput voća i povrća. Ova metoda koristi se i za dobivanje visokovrijednih biljnih ekstrakata ljekovitih biljka, bogatim biološki aktivnim spojevima najčešće monoterpenima, diterpenima, fenolnim kiselinama i flavonoidima. Također, sve je češća upotreba ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom u dobivanju polifenolnih ekstrakata iz biljnog otpada različitih industrija, kao što je npr. otpad u proizvodnji maslinovog ulja i vina (Khan i sur., 2018).

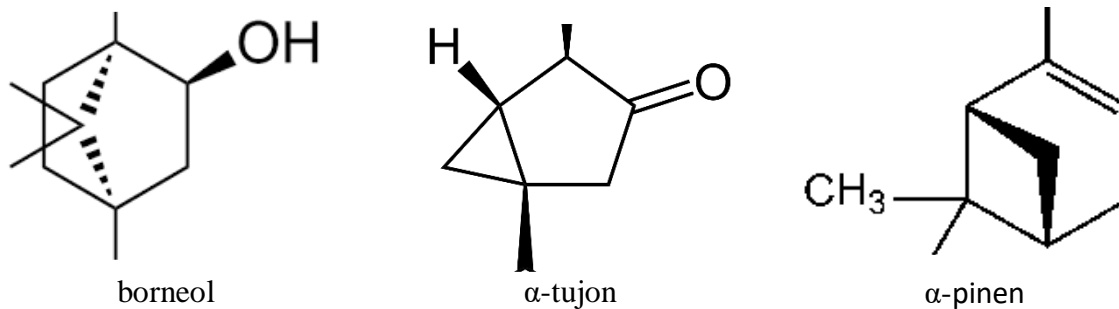
2.6. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNOG ULJA

Eterična ulja su složene smjese različitih kemijskih spojeva, koji se mogu podijeliti prema koncentraciji u kojoj su zastupljeni u eteričnom ulju. Najčešće kvantitativno najzastupljeniji spoj eteričnog ulja daje glavno obilježje ulju, poput mirisa, kemijskih i fizikalnih svojstava ili farmakološkog djelovanja. Do sada je identificirano više od 3000 različitih spojeva eteričnog ulja. U kemijskom sastavu eteričnih ulja u najvećem dijelu su zastupljeni terpeni i fenilpropanoidi te ostali spojevi koje čine ravnančani ugljikovodici s različitim funkcionalnim skupinama, te spojevi s dušikom i sumporom (Bayala i sur., 2014).

2.6.1. Terpeni

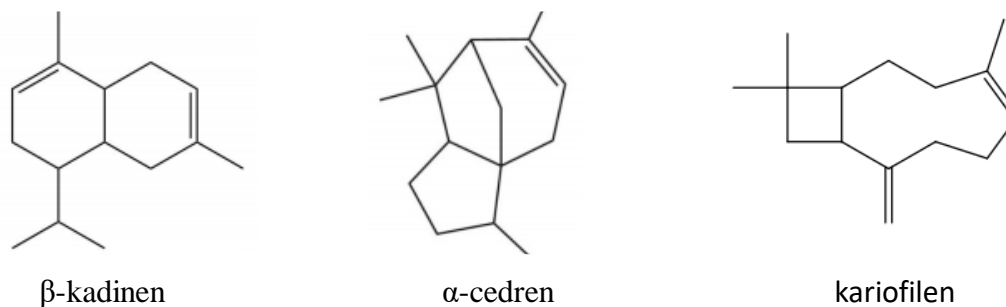
Unatoč tome što su eterična ulja složene smjese kemijskih spojeva, većina njih sadrži terpene. Terpeni su jednostavni ugljikovodici nastali kondenzacijom izoprenskih molekula (jedinice od pet ugljikovih atoma) te su prisutni u gotovo svim eteričnim uljima. Iako su jedna od glavnih skupina kemijskih sastojaka eteričnih ulja, oni se strukturno i funkcionalno razlikuju. Mogu biti aciklički, monociklički ili biciklički. Terpeni se prema broju ugljikovih atoma mogu podijeliti na monoterpene (C₁₀) i seskviterpene (C₁₅) koji predstavljaju glavne vrste terpena, a ostali terpeni su: hemiterpeni (C₅), diterpeni (C₂₀), triterpeni (C₃₀) i tetraterpeni (C₄₀) (Bhavaniramy i sur., 2019).

Monoterpeni nastaju kombiniranjem dviju osnovnih izoprenskih jedinica (C₁₀) i djeluju kao glavni spojevi (90 % sastava eteričnog ulja) te su značajno povezani s formiranjem velikog broja različitih struktura. Najznačajniji predstavnici acikličkih monoterpena su: mircen, linalool, citral, dok u monocikličke monoterpene ubrajamo: limonen, mentol, karvon, 1,8-cineol. Predstavnici bicikličkih monoterpena su: tujon, pinen, borneol, kamfor (Ludwiczuk i sur., 2017).



Slika 7. Prikaz monoterpenkih spojeva (Bayala i sur., 2014)

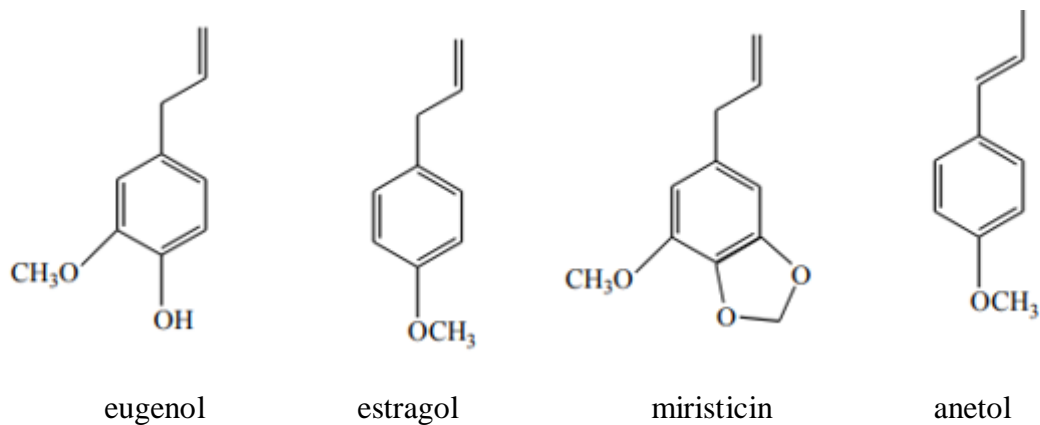
Seskviterpenski spojevi nastaju povezivanjem triju izoprenskih jedinica (C₁₅). U seskviterpenske spojeve se ubrajaju: β -kadien, α -cedren, kariofilen, eudesmol, aromadendren. Općenito su seskviterpeni manje zastupljeni u eteričnim uljima što se prepisuje većoj temperaturi vrelišta ovih spojeva (>200 °C) u odnosu na monoterpene (140-180 °C) (Ludwiczuk i sur., 2017).



Slika 8. Prikaz seskviterpenkih spojeva (Ludwiczuk i sur., 2017)

2.6.2. Fenilpropanoidi

Fenilpropanski derivati ili kako ih još nazivaju fenilpropanoidi su aromatični, prirodni spojevi eteričnih ulja. Fenilpropanoidi u svojoj strukturi sadrže fenilni prsten s jednim pobočnim propanskim lancem. U manjoj su mjeri zastupljeni u eteričnim uljima u odnosu na terpene. Unutar ove skupine spojeva razlikuju se dvije podgrupe spojeva: spojevi koji nastaju direktnim vezanjem za fenilni prsten i spojevi koji nastaju vezanjem na bočni, propanski lanac. Neki od predstavnika ove skupine spojeva su: estragol, eugenol, anetol, timol, elemicin, miristicin, cinamaldehyd, cinamil-alkohol, vanilin, stiren, karvakrol i dr. (Bayala i sur., 2014).



Slika 9. Prikaz fenilpropanoidnih spojeva (Ludwiczuk i sur., 2017)

2.7. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI U ETERIČNIM ULJIMA

Kemijski sastav eteričnog ulja utječe na njegovu biološku aktivnost. Glavne komponente kemijskog sastava eteričnog ulja mogu se podijeliti na terpene (monoterpeni s kisikom, seskviterpeni s kisikom, seskviterpeni s kisikom i fenilpropanske derivate te druge spojeve. Navedene skupine spojeva sadrže fenolne spojeve i u eteričnim uljima se identificiraju kao glavni, dominantni spojevi. Iako glavna komponenta eteričnog ulja određuje njegovo djelovanje, puni potencijal eteričnog ulja ostvaruje se sinergijskim djelovanjem svih njegovih komponenti. Eteričnim uljima pripisuju se različite funkcije od antioksidativnog, antibakterijskog, antivirusnog, antimikotičnog, protuupalnog, antitumorskog djelovanja. Ipak, eterična ulja najviše se istražuju zbog antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja. Među glavnim komponentama eteričnog ulja kojima su pripisana farmakološka djelovanja su: 1,8-cineol, kamfor i α -pinen (Borges i sur., 2019).

2.7.1 Eterično ulje kadulje

U eteričnom ulju kadulje u najvećoj koncentraciji su prisutni monoterpeni s kisikom (58,51 %) dok su monoterpeni s kisikom (3,81 %), oksigenirani seskviterpeni (22,28 %) i seskviterpeni s kisikom (6,29 %) prisutni u nižim udjelima. Miljanović i sur. (2020) su provedenom GC-MS analizom eteričnog ulja *S. officinalis* identificirali ukupno 71 spoj, predstavljajući tako 88,15 % ukupnog sastava eteričnog ulja. Rezultati su prikazani u Tablici 1. Rezultati istraživanja u skladu su s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da je postotak monoterpenih ugljikovodika viši od postotka seskviterpenih ugljikovodika (Elyemni i sur., 2019; Bouaziz i sur., 2009).

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da su najzastupljeniji spojevi eteričnog ulja kadulje: α -tujon (13,52 %), kamfor (12,99 %), veridiflorol (10,13 %), borneol (7,73 %), β -tujon (6,57 %), 1,8-cineol (5,22 %), α -humulen (3,15 %), linalool (2,17 %), berbenon (2,10 %), kamfen (1,49 %) i β -pinen (1,29 %).

Tablica 1. Prikaz kemijskog sastava eteričnog ulja kadulje (*Salvia officinalis* L.) dobivenog postupkom vodene destilacije po Clevengeru iz svježih listova biljke (Miljanović i sur., 2020)

Glavne komponente	Udio (%)
α -tujon	13,52
kamfor	12,99
veridiflorol	10,13
borneol	7,73
β -tujon	6,57
1,8-cineol	5,22
α -humulen	3,15
linalool	2,17
berbenon	2,10
kamfen	1,49
bornil acetat	1,31
α -pinen	1,25
<i>trans</i> -caryophyllene	1,21
α -terpineol	0,99
4-terpineol	0,92
δ -kadinen	0,67
<i>trans</i> -sabinyl acetat	0,62
karvakrol	0,50
β -pinen	0,45
thujyl alkohol	0,45
<i>trans</i> -pinokarvon	0,33
p-cimen-8-ol	0,28
γ -kadinen	0,26
α -terpenil acetat	0,25

2.7.2. Eterično ulje ružmarina

U eteričnom ulju ružmarina prisutni su: monoterpeni s kisikom (49,36 %), monoterpeni ugljikovodici (3,3 %), oksigenirani seskviterpeni (37,36 %), seskviterpeni ugljikovodici (1,88 %) te fenilpropanski derivati (0,02 %). Miljanović i sur. (2020) provedenom GC-MS analizom eteričnog ulja identificirali su 60 kemijskih spojeva, što predstavlja 91,92 % ukupnog sastava eteričnog ulja ružmarina. Rezultati istraživanja prikazani su u Tablici 2.

Eterično ulje ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) u svom kemijskom sastavu sadrži: u najvećem udjelu borneol (18,11 %), manool (13,47 %), berbenon (13,24 %), kamfor (12,77 %), 1,8-cineol (4,55 %) i linalool (4,02 %). Znanstvena istraživanja su potvrdila antimikrobna svojstva (Bajalan i sur., 2017), antioksidativna svojstva (Cutillas i sur., 2018; Mekonnen i sur., 2016) te protuupalno djelovanje eteričnog ulja ružmarina (Borges i sur., 2017).

Tablica 2. Kemijski sastav eteričnog ulja ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) dobivenog vodenom destilacijom po Clevengeru s predtretmanom (ekstrakcija uz refluks s dodatkom enzima celulaze) iz svježih listova biljke (Miljanović i sur., 2020)

Glavne komponente	Udio (%)
borneol	18,11
manool	13,47
berbenon	13,24
kamfor	12,77
veridiflorol	8,01
1,8-cineol	4,55
linalool	4,02
α -terpineol	2,81
α -pinen	2,77
t-muurolol	1,76
homoryrtenol	1,39
isopinocam	1,28
α -humulen	1,05
4-terpineol	0,90
α -tujon	0,87

kamfen	0,50
δ -kadien	0,50

2.7.3. Eterično ulje lavande

U eteričnom ulju lavande najzastupljenije komponente se: linalol (31,01 %), linalil antranilat (15,60 %), lavandulil acetat (15,01 %), cis-linalol oksid (4,96 %), α -terpinol (4,02 %), lavandulol (2,49 %), dok su geraniol, borneol, neril acetat, 1,8-cineol i dr. spojevi zastupljeni u manjim količinama (Tablica 3) (Rashed i sur. 2017). Razlikujemo četiri tipa kemotipa ovog ulja, a to su: verbenon/bornil acetat, 1,8-cineol, kamfor, β -mircen/kamfor. Pripisuju mu se snažna antibakterijska svojstva protiv gram pozitivnih bakterija (*B. subtilis*, *S. aureus*) i gram negativnih bakterija (*E. coli* i *P. aeruginosa*), gljivice *Candida sp.* te plijesni *Penicilium expansum* i *Aspergillus niger* (Smigielski i sur., 2018).

Tablica 3. Kemijski sastav eteričnog ulja lavande (*Lavandula angustifolia*) dobiven ultrazvučno-mikrovalnom potpomognutom vodenom destilacijom po Clevengeru s enzimskim predtretmanom (celulaza/hemicelulaza) iz suhih cvjetova biljke (Rashed i sur., 2017)

Glavne komponente	Udio (%)
linalool	31,01
linalil antranilat	15,60
lavandulil acetat	15,01
cis-linalool oksid	4,96
α -terpinol	4,02
lavandulol	2,49
1-okten-3-ol acetat	2,21
geraniol	1,73
borneol	1,64
1,8-cineol	1,26
neril acetat	1,23
terpinen-4-ol	0,56
nerol	0,55

endopronil acetat	0,51
3,7-oktadiene-2,6-diol-2,6-dimetil	0,48
santalen	0,37
kamfor	0,36
epoksilinalool	0,35

2.7.4. Eterično ulje timijana

U eteričnom ulju timijana (*Thymus vulgaris*) najzastupljenije komponente su uz timol (28,92 %) i karvakrol (26,18 %), p-cimen (13,25 %) i γ -terpinen (5,09 %), dok su ostali spojevi: α -pinen, α -salinen, β -kariofilen, linalool, α -terpinen, β -mircen i dr. prisutni u manjim udjelima (Khalili i sur., 2018). Karvakrol i timol su izomerni fenolni spojevi koji mogu djelovati protiv širokog spektra patogenih bakterija. Karvakrol i timol pokazuju izraziti hidrofobni karakter te se mogu akumulirati u plazmatskoj membrani bakterijske stanice te uzrokovati pad membranskog potencijala. U istraživanju Ultee i sur. (2002) istraženo je kako karvakrol djeluje na smanjenje pH preko plazmatske membrane djelujući kao izmjenjivač protona. Ovaj spoj ima hidroksil radikal u orto položaju te prolazi kroz membranu citoplazmu bakterije gdje oslobađa proton, a veže kalijev ion. Nakon toga vraća se u staničnu membranu gdje oslobađa kalijev ion te ponovno veže proton ponavljajući ciklus. Kao rezultat tog postupka smanjuje se količina ATP-a u stanici, što dovodi do nemogućnosti održavanja vitalnih procesa te u konačnici do smrti bakterije. Stoga se ove dvije komponente eteričnog ulja i timijana i majčine dušice smatraju snažnim antibakterijskim agensima (Gama Nieto, 2020). Karvakrol pokazuje dobra antioksidativna svojstva pa se koristi u prehrambenim proizvodima kao što su pića i slatkiši kao konzervans i sredstvo za aromatiziranje (Bhavaniramya i sur., 2019).

Tablica 4. Kemijski sastav eteričnog ulja timijana dobivenog vodenom destilacijom po Clevengeru iz listova biljke (Khalili i sur., 2018)

Glavne komponente	Udio (%)
timol	28,92
karvakrol	26,18
β -cimen	13,25
γ -terpinen	5,09
α -pinen	4,54
α -salinen	4,07
β -kariofilen	2,49
linalool	2,14
α -terpinen	1,27
spatulenol	1,18
β -mircen	1,04
β -pinen	0,90
allo-aromadendren	0,75
kariofilen oksid	0,73
1,8-cineol	0,44
limonen	0,42
terpinen-4-ol	0,42
kamfen	0,27
α -tujen	0,24

2.7.5. Eterično ulje majčine dušice

Najzastupljenije komponente eteričnog ulja *T. serpyllum* su: timol (56,02 %), zatim karvakrol (14,00 %) i *p*-cimen (6,2 %). Thompson i sur. (2003) identificirali su timol (30 %) i karvakrol (20 %) kao drugu glavnu komponentu eteričnog ulja. U literaturi rezultati kemijskog sastava eteričnog ulja *T. serpyllum* pokazuju neka odstupanja u kemijskom sastavu glavnih komponenti eteričnog ulja. Pa tako Sfaei-Ghomi i sur. (2009) u svom istraživanju navode da su: α -pinen i karvakrol glavne komponente ulja, a Rasooli i Mirmostafa (2002) navode timol kao treću komponentu (>18 %) u ulju divljeg timijana, nakon α -terpinena (>22 %) i *p*-cimena (>20 %).

Tablica 5. Kemijski sastav eteričnog ulja majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.) dobivenog vodenom destilacijom po Clevengeru iz drvenastog dijela biljke (Nikolić i sur., 2014)

Glavne komponente	Udio (%)
timol	38,5
<i>p</i> -cimen	8,9
γ -terpinen	7,2
bornil acetat	7,0
borneol	6,0
karvakrol	4,7
timol metil eter	3,8
timol acetat	2,8
linalool	2,4
kamfen	2,4
α -pinen	2,0
β -mircen	1,3
β -kariofilen	1,3
α -tujon	1,1
α -terpinen	1,1
β -bisabolen	1,0
sabinen	0,8
kamfor	0,7
terpinen-4-ol	0,7

limonen	0,6
<i>cis</i> -sabinen hidrat	0,5
eudesm-3-en-6-ol	0,5
kariofilen oksid	0,4
spatulenol	0,3
karvakrol acetat	0,3
α -eudesmol	0,2
α -terpinolen	0,2
β -pinen	0,2
aromadendren	0,1
izobornil acetat	0,1

2.7.6. Eterično ulje lovora

U eteričnom ulju lovora u najvećoj koncentraciji prisutni su monoterpeni s kisikom (60,32 %), monoterpenski ugljikovodici (5,78 %), oksigenirani seskviterpeni (5,54 %), seskviterpenski ugljikovodici (11,48 %) te fenilpropanski derivati (14,57 %). Miljanović i sur. (2020) provedenom GC-MS analizom eteričnog ulja identificirali su 84 kemijska spoja, što predstavlja 92,28 % ukupnog sastava eteričnog ulja lovora. Rezultati istraživanja prikazani su u Tablici 6. U eteričnom ulju lovora najzastupljeniji kemijski spojevi su: 1,8-cineol (19,56 %), α -terpenil acetat (15,84 %), metil eugenol (7,95 %), eugenol (5,64 %), linalool (4,92 %), α -terpineol (3,84 %), *trans*-caryophyllen (2,92 %), kamfor (1,93 %) (Miljanović i sur., 2020).

Istraživanje Fidan i sur. (2019) pokazalo je da se najviše eteričnog ulja nalazi u listovima (3,25 %), zatim u grančicama lovora (0,80 %), a najmanje u plodovima lovora (0,78 %). Eterično ulje lovora ima dokazano snažno antibakterijsko djelovanje koje se pripisuje djelovanju 1,8-cineola. Ispitivanje djelovanja 1,8-cineola i eteričnog ulja lovora u različitim koncentracijama na djelovanje pet bakterijskih sojeva, tri gram-pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (4313), *B. cereus* (4384) i dvije gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* pokazalo je značajnu inhibiciju protiv navedenih bakterija (Caputo i sur. 2017). Eterično ulje lovora u usporedbi s 1,8-cineolom pokazuje ipak nešto bolji rezultate što se pripisuje sinergijskom djelovanju svih kemijskih spojeva ulja.

Tablica 6. Kemijski sastav eteričnog ulja lista lovora (*Laurus nobilis* L.) dobivenog vodenom destilacijom po Clevengeru s ultrazvukom kao predtretmanom iz svježih listova biljke (Miljanović i sur., 2019)

Glavne komponente	Udio (%)
1,8 cineol	19,56
α -terpenil acetat	15,84
metil eugenol	7,95
eugenol	5,64
linalool	4,92
α -terpineol	3,84
<i>trans</i> -caryophyllen	2,92
kamfor	1,93
sabinen	1,74
4-terpineol	1,71
spatulenol	1,62
borneol	1,55
β -elemen	1,53
bicyclogerm acren	1,40
α -tujon	1,18
veridiflorol	1,16
kariofilen oksid	1,07
α -pinen	1,10
t-muurolol	1,06
germakren A	0,87
β -pinen	0,84
δ -kadien	0,81
limonen	0,76
germakren D	0,63
β -selinen	0,63

2.8. NUSPRODUKTI PROIZVODNJE ETERIČNIH ULJA

2.8.1. Hidrolati

Hidrolati nastaju tijekom ekstrakcije eteričnih ulja iz aromatičnih biljaka, sastoje se od kondenzirane vode u procesu destilacije i od polarnih, hidrofilnih, hlapljivih komponenata ulja koje tvore vodikove veze s vodom. Oni su mješavina koja sadrži promjenjivu količinu eteričnog ulja (obično manju od 1 g L^{-1}) i hlapljive, u vodi topljive, sekundarne metabolite (D'Amato i sur., 2018). Dugo vremena su se hidrolati definirali kao otpadni proizvodi vodene destilacije sve dok se nije istražila njihovu važnost analizirajući njihovu antimikrobnu i antifungalnu sposobnost (D'Amato i sur., 2018).

Hidrolati se u literaturi nazivaju različitim nazivima: hidrosol, hidrolat, hidroflorat, biljni aromatični otpad, aromatična voda, cvjetna voda, esencijalna aromatična voda. Nastaju tijekom vodene destilacije na način da se eterično ulje koje je izuzetno slabo topivo u vodi, izdvaja na površini vode, a voda ostaje ispod njega, zasićena njegovim sastojcima. Osim što se upotrebljavaju u kozmetičke svrhe, njihova primjena puno je šira, hidrolati se piju, grgljaju, te dodaju hrani (D'Amato i sur., 2018).

2.8.1.1. *Kemijski sastav hidrolata*

Hidrolati dobiveni u ranom i kasnom dijelu destilacije razlikuju se po mirisnim notama i kemijskom sastavu. To je zbog njihovog sadržaja terpenoida niskog i visokog vreñja. Pa se tako aromatični kemijski profil hidrolata može značajno razlikovati od odgovarajućeg eteričnog ulja zbog nedostatka hidrofobnih, u vodi netopljivih ugljikovodika (Rajeswara Rao, 2013).

Biološka aktivnost hidrolata pripisuje se prisutnosti kemijskih komponenata koje su karakterizirane svojim funkcionalnim skupinama. Antimikrobna aktivnost hidrolata izražena je zahvaljujući glavnim biološki aktivnim komponentama koje nalazimo i u eteričnom ulju. Zapravo u većini slučajeva, kemijski sastav glavnih komponenti hidrolata podudara se s onima u eteričnom ulju, iako su ti spojevi prisutni u mnogo manjim količinama. No, ponekad se kemijski sastav hidrolata može i znatno razlikovati. Inouye i sur. (2008) su odredili kemijski sastav glavnih komponenti eteričnog ulja i hidrolata ružmarina, u 42 % slučajeva udjeli glavnih komponenti u hidrolatima su prisutni u znatno manjim udjelima od onih u eteričnim uljima. Usporedbom kemijskog sastava eteričnog ulja i hidrolata timijana od 24 analiziranih spojeva, 14 je otkriveno u odgovarajućem eteričnom ulju, dok je 10 oksidiranih spojeva identificirano

samo u hidrolatu. U hidrolatu su nedostajali neki sastojci, poput α -terpinena, mircena, kamfena i limonena (Karampoula i sur., 2016). Većina tih spojeva je netopljiva u vodi, dok neki drugi brzo nestaju iz kiselih hidrolata s različitim mehanizmima razgradnje (Lei i sur., 2014). Neke molekule pronađene samo u hidrolatu mogu proizaći iz kemijskih reakcija koje su nastale tijekom postupka destilacije, prije analize plinskom kromatografijom (Garneau i sur., 2014). Najzastupljenijim kemijskim spojevima hidrolata smatraju se monoterpeni s kisikom, dok često monoterpenski ugljikovodici i seskviterpenski ugljikovodici nisu prisutni ili ako jesu u jako malim količinama (D'Amato i sur., 2018). Smigielski i sur. (2013) usporedili su sastav eteričnog ulje i hidrolata *Lavandula angustifolia*. Hidrolat je imao sljedeće glavne komponente: linalool (26,5 %), borneol (9,0 %), *cis*-linalool oksid (6,6 %), *trans*-linalool oksid (5,2 %). Jedna od glavnih komponenti eteričnog ulja, linalil acetat, nije pronađena u hidrolatu. Također monoterpeni i seskviterpeni prisutni u eteričnom ulju lavande bili su u potpunosti odsutni u hidrolatu. Iz prikupljenih podataka proizlazi da se kemijski sastav hidrolata i eteričnih ulja dobivenih iz biljke uvijek razlikuje ne samo kvantitativno, već često i kvalitativno.

Poznavanje kemotipa hidrolata iznimno je važno kako bi se razumio mehanizam njegove biološke aktivnosti i usmjerila njegova upotreba za specifičnu primjenu u prehrambenoj industriji ili nekoj drugoj industriji (D'Amato i sur., 2018). Kemijski spojevi koji se nalaze u hidrolatima, kao i oni u eteričnim uljima imaju različite funkcije od antioksidativnog, antibakterijskog, antivirusnog, protuupalnog djelovanja. Zbog prisutnosti biološki aktivnih komponenti koriste u različitim kozmetičkim pripravcima kao što su kreme, losioni, tonici. Hidrolati se pak najčešće istražuju zbog svog antifungalnog i antibakterijskog svojstva. Zbog tih svojstava raste njihova upotreba i u prehrambenoj industriji. Biološki aktivni spojevi koje nalazimo u hidrolatima lovora (1,8-cineol, eugenol, linalool, β -selineol) ružmarina (α -terpineol, borneol, kamfor, N-metil eukaliptol), kadulje (linalool, δ -kadien, karvakrol), te timijana (karvakrol i timol), pokazuju dobra antibakterijska svojstva protiv patogena koji se prenose hranom kao što su *Salmonella Typhimurium* i *Escherichia coli* O157:H7 (Tornouk i sur., 2011).

2.8.2. Biljni ostatak

Prilikom ekstrakcije eteričnih ulja iz ljekovitih biljaka, kao nusproizvod se osim hidrolata, vodenog ostatka dobije i biljni ostatak. Biljni ostatak predstavlja visokovrijednu sirovinu bogatu biološki aktivnim komponentama poput sterola, tokoferola, terpena i polifenola. Ponovnom ekstrakcijom biljnog ostatka dobiju se biljni ekstrakti bogati polifenolima. Dobiveni biljni ekstrakti imaju antioksidativni učinak i kao takvi mogu se koristiti u proizvodnji funkcionalne hrane, mogu poslužiti kao začini i aditivi u produljenju roka trajanja proizvoda, a mogu se koristiti u proizvodnji dodataka prehrani i drugim farmaceutskim pripravcima (Kumar i sur., 2019; Pavlić i sur., 2017). U proizvodnji biljnih ekstrakata koriste se nekonvencionalne metode ekstrakcije (ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, mikrovalovima, visokim hidrostatskim tlakom, enzimima, ekstrakcija potpomognuta superkritičnim plinom i dr.), a ponekad se paralelno provodi konvencionalna ekstrakcija (najčešće Soxhlet ekstrakcija). Za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnog materijala najčešće se koriste otapala: etanol, metanol, aceton i etil acetat te njihove vodene otopine. Primjena vode u kombinaciji s drugim organskim otapalima čini polarni medij koji osigurava optimalne uvjete za ekstrakciju, stoga voda u kombinaciji s alkoholima dovodi do bubrenja biljnog materijala i povećanja kontaktne površine između biljnog materijala i smjese otapala (Rafiee i sur., 2011). Također, kako bi povećali prinos polifenolnih spojeva u ekstraktu, u otapalo za ekstrakciju može se dodati neka od slabih organskih kiselina kao što su vinska, mravlja, limunska (0,5-3 %). Osim navedenih kiselina vrlo uspješno se dodatkom klorovodične kiseline može povećati udio izolirane ružmarinske kiseline. Dodatak 1 % klorovodične kiseline u otopinu etanol-voda (70:30), ali i drugim otapalima pridonosi 37 %-tnom povećanju ekstrahirane ružmarinske kiseline kod ružmarina, 85 % kod kadulje te 57 % kod majčine dušice. Razlog povećanja prinosa se objašnjava time da se derivati glikozida ružmarinske kiseline kod porodice Lamiaceae prevode u aglikonske oblike dodatkom HCl-a (Putnik i sur., 2016; Sik i sur., 2020).

2.8.2.1. Kemijski sastav biljnih ekstrakata

Biljni ekstrakti bogati su različitim polifenolnim spojevima, a njihov kemijski sastav razlikuje se ovisno o biljnoj vrsti. Polifenolni spojevi čine jednu od najbrojnijih i najrasprostranjenijih skupina prirodnih spojeva. Raznolikost spojeva i njihova rasprostranjenost doveli su do različitih načina klasifikacije ovih spojeva. Prema kemijskoj strukturi polifenole možemo podijeliti na: fenolne kiseline i flavonoide. Od svih fenolnih spojeva, kojih je do danas poznato oko 8000, najviše je flavonoida, njih 4000 (Tsao, 2010). Osnovna flavonoidna struktura je jezgra flavana koja sadrži 15 C atoma raspoređenih u tri prstena (C6-C3-C6). Flavonoidni spojevi se mogu podijeliti u šest podskupina: flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni i antocijani. Fenolne kiseline mogu se podijeliti u dvije podskupine, a to su derivati benzojeve kiseline i derivati cimetine kiseline (Dai i Mumper, 2010).

Biljke iz porodice Lamiaceae i Lauraceae bogat su izvor polifenolnih spojeva i imaju važnu ulogu u ljudskom zdravlju. Biljni ekstrakti bogati su polifenolnim spojevima i različitim terpenoidima, a najčešće se istražuju zbog svoj antioksidativnog djelovanja. Općenito se smatra da unos biljnih vrsta koje u svom sastavu sadrže veliku količinu polifenolnih spojeva smanjuje rizik od mnogih kroničnih bolesti, uključujući rak, kardiovaskularne bolesti, kronične upale i degenerativne bolesti. Istraživanja su otkrila kako je danas sve više bolesti povezano s antioksidativnim stresom reaktivnih vrsta kisika i dušika. Dokazao je da su polifenolni spojevi snažni antioksidansi koji imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala donirajući elektron ili atom vodika. Fenolni spojevi smanjuju brzinu oksidacije inhibiranjem stvaranja aktivnih vrsta prekursora slobodnih radikala. Također, djeluju i kao hvatači izravnih radikala lančanih reakcija peroksidacije lipida. Osim sposobnosti uklanjanja radikala, polifenoli imaju sposobnost keliranja metala. Keliranje atoma željeza Fe^{2+} može izravno smanjiti brzinu Fentove reakcije, sprječavajući tako oksidaciju uzrokovanu visoko reaktivnim hidroksilnim radikalima. Smatra se i da polifenoli mogu djelovati kao dodatni antioksidansi i sudjelovati u regeneraciji vitamina u tijelu (Tsao, 2010). Biološka aktivnost biljnih ekstrakata pripisuje se fenolnim kiselinama, flavonoidima, terpenima (mono i diterpeni). U biljnim ekstraktima majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.) zastupljeni su: kafeinska kiselina, klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, vanilinska te ferulinska kiselina. Od flavonoida najzastupljeniji su: kvercetin, rutin, izokvercetin (Barnes i sur., 2001). U biljni ekstraktima timijana (*Thymus vulgaris* L.) identificirani su: kafeinska kiselina, karnozna kiselina, ferulinska kiselina i njeni derivati, ružmarinska kiselina, cimetna kiselina, apigenin, luteolin-7-*O*-rutinoza, dok su u ekstraktima kadulje (*Salvia officinalis* L.) glavne komponente biljnih ekstrakata: ružmarinska kiselina,

salvianolna K kiselina, ferulinska kiselina, kafeinska, apigenin i luteolin glikozidi, luteolin-7-rutinoza, kvercetin-7-*O*-glukozid, karnozna kiselina (Roby i sur., 2013; Dent i sur., 2013; Putnik i sur., 2015).

2.8.3. Vodeni ostatak

Vodeni ostatak koji zaostaje kao nusprodukt u proizvodnji eteričnih ulja zapravo predstavlja vodeni ekstrakt. Vodeni ekstrakt koji ostaje nakon vodene destilacije biljnog materijala, predstavlja vrijedan izvor biološki aktivnih komponenti (Castro-Puyana i sur., 2017). Voda je jedno od najčešće korištenih otapala u ekstrakciji jer netoksična, nezapaljiva, još uvijek lako dostupna, te postoji u tekućem stanju pri relativno visokim temperaturama. Iako je voda polarno otapalo ona može otopiti više vrsta spojeva. Ionski i polarni spojevi lako se otapaju u vodi dok porastom temperature ekstrakcije dolazi do otapanja manje polarnih komponenti. Razlog tome je smanjenje dielektrične konstante vode, smanjenje polariziranosti i sposobnosti stvaranja vodikovih veza. Zbog navedenih svojstava, voda se smatra jedinstvenim otapalom čija se svojstva mogu podešavati korigiranjem temperature vode. Primjenom vode kao ekstrakcijskog otapala osim što se mogu ekstrahirati polifenolni spojevi iz biljnog materijala, vodeni ekstrakti mogu sadržavati i visoke udjele šećera, proteina, organskih kiselina koji onda mogu utjecati na identifikaciju polifenolnih spojeva (Castro-Puyana i sur., 2017).

2.8.3.1. Kemijski sastav vodenog ekstrakta

Primjena vode kao otapala u izolaciji fenolnih spojeva iz kadulje se pokazala učinkovitom, izoliran je niz fenolnih kiselina i flavon glikozida (Dent i sur., 2013). Isto su potvrdili i Sotiropoulou i sur. (2020) koji su ispitali utjecaj temperature na prinos vodenih infuzija kadulje, gdje je temperatura ekstrakcije utjecala na ukupni udio polifenola, pokazujući da je najviši prinos polifenolnih spojeva (između temperatura 25, 80 i 100 °C) dobiven pri 80 °C. U vodenim infuzijama kadulje pripremljenih pri temperaturi od 80 °C najzastupljeniji kemijski spojevi su: ružmarinska kiselina, salvianolna kiselina K i luteolin-7-*O*-glukuronid. U vodenim ekstraktima lavande (*Lavandula angustifolia* L.) prisutne su fenolne kiseline, ferulinska kiselina, ružmarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, dok su dominantni flavonoidi kvercetin, apigenin, kamferol prisutni u obliku glikozida (Spiridon i sur., 2011).

Muniz-Marquez i sur. (2018) u vodenim ekstraktima lovora identificirani su: *o*-kumarinsku kiselinu, galnu kiselinu, pirogalol, rezorcinol, kumarinsku kiselinu. Odabir ekstrakcijskog

otapala kao i polarnost otapala ima utjecaj na ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz biljaka te se primjenom vode kao jedinog otapala postiže oko 20 % slabiji učinak, te stoga vodeni ekstrakti sadrže nešto niže udjele fenolnih spojeva od biljnih ekstrakata dobivenih primjenom organskih otapala uz dodatak vode (Wang i sur., 2004, Dent i sur., 2013).

2.9. TOKSIČNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA

Eterična ulja i prirodni ekstrakti ljekovitih biljnih vrsta označeni su kao GRAS (eng. *Generally Recognized As Safe*) ili općenito prepoznato kao sigurno od strane američke Agencije za hranu i lijekove (FDA). Međutim, ne postoji procjena dnevnoga unosa eteričnih ulja kao ni začina i začinskog ljekovitog bilja. Stoga bi preporučene dnevne unose trebalo dodatno istražiti i razmotriti sva dosadašnja istraživanja o primjeni eteričnih ulja u prehrambenoj industriji, kako bi se njihova primjena mogla regulirati te biti dio vodiča i smjernica za zdravu prehranu. Primjena i korištenje eteričnih ulja treba biti kontrolirano jer ukoliko se koriste u prevelikim količinama mogu prouzročiti sistemske toksične učinke, alergiju, i dr. (Gema Nieto, 2020).

3. POTENCIJALNA PRIMJENA ETERIČNIH ULJA, BILJNOG EKSTRAKTA I HIDROLATA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Sigurnost hrane jedan je od najvažnijih zahtjeva javnoga zdravstva. Slučajevi trovanja hranom koji su uzrokovani kontaminacijom hrane s patogenim bakterijama (*Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7) su u potrazi za novim rješenjima u područjima sigurnosti hrane. Već dugi niz godina proizvođači koriste sintetičke konzervanse u prehrambenoj industriji, što može dovesti do alergijskih učinaka, intoksikacije, raka i drugih degenerativnih bolesti. Iz ovih razloga, razvila se potreba za drugim prirodnim izvorima konzervansa. Eterična ulja i prirodni ekstrakti ljekovitih biljnih vrsta (lovor, kadulja, ružmarin, timijan, majčina dušica, lavanda) su označeni kao GRAS ili općenito prepoznato kao sigurno od strane FDA. Primjena eteričnih ulja, bilo kao konzervansa u hrani ili da se nalaze u sastavu pakiranja ili jestivih premaza, temelji se na dobrom antioksidativnom svojstvu eteričnih ulja. Porodica Lamiaceae jedna je od najvažnijih u proizvodnji eteričnih ulja s antimikrobnim i antioksidativnim djelovanjem. Biološka svojstva pojedinog eteričnog ulja biljne vrste ovisit će o njegovom kemotipu. Iz toga razloga potrebno je dobro poznavati kemijski sastav i stabilnost spojeva ulja. Važno je spomenuti i fenomen antimikrobne otpornosti koji nije poštedio ni prehrambenu industriju i kao rezultat toga, razne bakterije postale su otporne na često korištena konzervirajuća sredstva. Pa je stoga prisutna sve veća upotreba ekstrakata aromatičnih ljekovitih biljaka i njihovih eteričnih ulja zbog sposobnosti kontroliranja rasta patogenih mikroorganizama. Dokazano je i da pojedine hlapljive komponente pojačavaju antimikrobno djelovanje eteričnog ulja zbog sinergijskog učinka kao što je to slučaj kod eteričnog ulja ružmarina gdje dolazi do sinergijskog učinka α -pinena i 1,8-cineola (Bhavaniramy i sur., 2019).

3.1. Antimikrobni učinci eteričnih ulja

Razlog zbog kojeg bakterije nisu uspjele razviti rezistenciju na eterična ulja leži u tome što su eterična ulja smjese različitih biološki aktivnih kemijskih spojeva koje imaju različite mehanizme djelovanja, za razliku od antibiotika ili nekih konzervansa u hrani. Kod njih postoji samo jedan mehanizam djelovanja na bakteriju. Da bi bakterija razvila otpornost znači da mora istovremeno dobiti nekoliko novih gena, što je nemoguće (Marković, 2005). Smatra se da se mehanizmi djelovanja eteričnih ulja temelje na djelovanju biološki aktivnih komponenti na citoplazmatsku membranu i staničnu stijenkku bakterija. Time će doći do propusnosti stanične membrane i povećanja fluidnosti, a kao posljedica toga dolazi do poremećaja staničnih proteina, inhibicije staničnog disanja i ionskog transporta (Reichling i sur., 2009).

Jedna od mogućih primjena eteričnih ulja u prehrambenoj industriji je primjena u mljekarskoj industriji pri proizvodnji svježih sireva. Antimikrobna svojstva eteričnog ulja u svježim sirevima ispitali su Diniz-Silva i sur. (2019) koji su se bavili sinergijskim učinkom eteričnih ulja origana i ružmarina na bakteriju *Escherichia coli* O157:H7. Neke od karakteristika svježega sira su meka tekstura, manji udio soli, visoka kiselost i vlažnost. Pa je tako svježi sir pogodan medij za rast i razmnožavanje mikroorganizama koji dovode do kvarenja sireva i ekonomskih gubitaka. Danas se sve više istražuje upotreba eteričnih ulja kao npr. ružmarina i origana koji su se pokazali učinkovitim u inhibiciji rasta bakterija koje su povezane s kvarenjem sireva u *in vitro* sustavima (Asensio i sur., 2015). Često potrebne količine ovih pojedinačnih eteričnih ulja premašuju osjetni prag zbog njihovog jakog okusa i mirisa. Za smanjenje senzorskih utjecaja eteričnih ulja ružmarina i origana na hranu, bez promjene njihovih antimikrobnih svojstava moguća je njihova kombinirana upotreba (Barbosa i sur., 2016). Prethodna istraživanja Barbosa i sur. (2016) dokazali su sinergijski učinak ovih eteričnih na inhibiciju *Staphylococcus aureus* u uzorcima svježih sireva tijekom 72 h skladištenja pri temperaturi hladnjaka. U ovom istraživanju eterična ulja su dodana nakon rezanja grušna na kockice, a kontaminirani su s *Escherichia coli* O157:H7 nakon same proizvodnje. Dobiveni sir je vakuumiran te skladišten tijekom 21 dana pri temperaturi od 7 °C. Svaka tri dana uzimani su uzorci sira kako bi se provela analiza rasta mikroorganizama te analiza terpenskog sastava sira koja potječe od eteričnih ulja. Rezultati istraživanja su pokazali da je u homogeniziranom svježem siru s kombinacijom eteričnih ulja ružmarina i origana došlo do smanjenja količine *E. coli* u odnosu na kontrolni uzorak (bez eteričnih ulja). Broj ove patogene bakterije smanjio se za približno 1,5 log CFU g⁻¹ nakon 6 dana skladištenja, a nakon 12 dana skladištenja došlo je do smanjenja broja *E. coli* za 3 log CFU g⁻¹. U kontrolnom uzorku sira (bez dodatka eteričnih

ulja) početni broj *E. coli* se povećao za 1,5 log CFU g⁻¹ nakon šestog dana skladištenja, a nakon 21 dan došlo je do porasta od 2,8 log CFU g⁻¹.

Kod ovog istraživanja treba uzeti u obzir da su koncentracije eteričnih ulja koje se nalaze u sastavu sira (0,03 µL g⁻¹ eteričnog ulja origana i 1,32 µL g⁻¹ eteričnog ulja ružmarina) određene s obzirom na minimalne inhibitorne koncentracije MIC ulja (eng. *Minimum Inhibitory Concentration*) koje neće ugroziti preživljavanje upotrijebljene starter kulture mikroorganizama. Tijekom postupka proizvodnje, izdvajanjem sirutke dio eteričnih ulja se izgubio. No, unatoč tome ostvareno je dobro antimikrobno djelovanje kombiniranog sastava eteričnih ulja te su ovi rezultati vrijedni pažnje jer potpuna inhibicija mikroorganizama zahtjeva puno veće koncentracije eteričnih ulja od onih koje inhibiraju starter kulturu *Lactococcus spp.* Istraživanje je pokazalo da eterična ulja nisu utjecala bitno na fizikalno-kemijske parametre te je sir senzorski okarakteriziran osvježavajuće arome i mekoće. Terpenski sastav eteričnih ulja origana i ružmarina smanjio se tijekom skladištenja što se povezuje karakterističnim svojstvom hlapljivosti terpena kao i sposobnosti da reagiraju s različitim komponentama unutar sira (proteini, masti). Također, na terpenski sastav moglo je utjecati pakiranje (polietilenski sastav pakiranja) i pojava vode (sinereza) u pakiranju. Pad u broju *E. coli* nije zamijećen nakon dvanaestog dana što se može povezati s manjim udjelom terpenskih spojeva u siru. Broj *E. coli* mjeran nakon 21 dana skladištenja odgovara onom koji se u kontrolnom uzorku (bez eteričnih ulja) izmjeri nakon 9. dana. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da smjesa eteričnih ulja origana i ružmarina odgađa rast i ne ugrožava preživljavanje *Lactococcus spp.*, dok smanjuje preživljavanje *E. coli* O157:H7 u svježem siru tijekom skladištenja. Eterična ulja dala su ovom proizvodu specifične senzorne karakteristike i predstavljaju inovativnu strategiju za očuvanje ukupne kvalitete svježeg sira tijekom skladištenja. Međutim, upotrebu smjese eteričnih ulja u svježem siru izrađenom od starter kultura *Lactococcus spp.* treba pažljivo procijeniti uzimajući u obzir promjene koje mogu nastati u karakteristikama ovog proizvoda te kako bi se postigli željeni antimikrobni učinci na *E. coli* O157:H7.

3.2. Upotreba biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji

Biljni ekstrakti ljekovitih aromatskih biljaka predstavljaju značajan izvor fenolnih spojeva. Jedna od biljaka bogata fenolnim spojevima je i lovor (*Laurus nobilis* L.). Bogat fenolni sastav ove biljke omogućava jako antioksidativno djelovanje na uklanjanje slobodnih radikala i sprječavanje antioksidativnog stresa u stanicama. No, polifenoli su nestabilne biljne komponente koje su osjetljive na djelovanje kisika, visokih temperatura, ultraljubičastog zračenja te na uvjete probave u želudcu. Kako bi se zaštitila njihova biološka uloga, biljni ekstrakti mogu se različitim procesima inkapsulirati. Tako nastali praškasti proizvod može se koristiti u prehrambenoj industriji kao konzervans i začim ili kao dodatak različitim funkcionalnim prehrambenih proizvodima. Proizvodnju praškastog biljnog ekstrakta lovora mikroinkapsulacijom proveli su Medina-Torres i sur. (2016) koristeći proces sušenja raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem pretvara tekuću suspenziju polifenola u fini prah koji se sastoji od mikročestica. Nastale čestice sastoje se od omotača što je uvijek neki inertni materijal te jezgre koja predstavlja inkapsulirani materijal. Ugljikohidrati poput maltodekstrina jedan je od glavnih materijala koji se koriste pri mikroinkapsulaciji. Maltodekstrin je hidrolizirani škrob, koji posjeduje visoku topljivost u vodi (>75 %), malu viskoznost u vodenim otopinama te nisku cijenu. Maltodekstrin čini prevlaku koja smanjuje kontakt kisika i inkapsuliranog materijala. Sušenje raspršivanjem smatra se idealnim postupkom za postizanje stabilnosti polifenolnih spojeva i zaštite njihove biološke aktivnosti.

3.3. Upotreba eteričnih ulja u izradi jestivih ambalaža

Jestivi film ili premaz predstavlja tanki sloj jestivog materijala koji se može stavljati na hranu ili između komponenata hrane u pakiranju. Jestivi film ili premaz, može se jesti zajedno s hranom sa ili bez daljnjeg uklanjanja. Ovaj oblik ambalaže sve više se upotrebljava u prehrambenoj industriji zbog dobrih barijernih svojstava na vodu, plinove, UV-zračenje koji će utjecati na bolju kvalitetu konačnih proizvoda, produljiti rok trajanja, poboljšati organoleptička i mehanička svojstva proizvoda i smanjiti količinu otpadnog materijala. Za izradu jestive ambalaže koriste se proteini, polisaharidi, voskovi i lipidi. Mogu se dodavati različite vrste plastifikatora koji imaju ulogu da smanje lomljivost tj. povećaju fleksibilnost i otpornost na lomove (glicerin, sorbitol, saharoza, kukuruzni sirup i dr.) te funkcionalni aditivi (različiti antioksidansi, antimikrobne tvari, nutrijenti). Jestiva ambalaža upotrebljava se dugi niz godina u industriji, a neki od najčešćih primjera jestivih ambalaža su kapsule, ovitci za kobasice, čokoladne prevlake, prevlake od šećera i sl. Mnoštvo studija potvrdilo je potencijalnu primjenu eteričnih ulja pri izradi jestive aktivne ambalaže u prehrambenoj industriji zbog svoje funkcionalne sposobnosti kao antimikrobnog i antioksidativnog sredstava. Aktivna ambalaža označava materijale koji u svom sastavu mogu sadržavati tvari koje se oslobađaju u pakirani proizvod ili im je funkcija da apsorbiraju tvari iz pakiranja (Galić, 2009).

Filmovi s eteričnim uljem lovora pokazali su se kao vrlo pogodni u proizvodnji jestivih aktivnih pakiranja. Karboksimetil celuloza (CMC) korištena je za pripremu filmova primjenom različitih koncentracija eteričnih ulja lovora, gdje je CMC film s 15 % eteričnog ulja lovora pokazao je najbolja barijerna svojstva na djelovanje vodene pare, čak 50 % bolja svojstva u odnosu na CMC filmove bez eteričnih ulja (Rincon i sur., 2019). Rezultati su pokazali i da se optička barijerna svojstva povećavaju s većim udjelom eteričnog ulja (veći udio kemijskih spojeva), s već 15 %-tnim udjelom eteričnog ulja u CMC filmovima ta su se svojstva povećala za 97 %. To bi trebalo pridonijeti sprečavanju oksidacije lipida u hrani te produžiti rok trajanja hrane. Istraživanje Rincon i sur. (2019) je pokazalo i da su pripremljeni filmovi u stanju djelomično ili u potpunosti inhibirati rast određenih mikroorganizama koji su česti patogeni u hrani kao što je to *Escherichia coli* i *Candida glabrata*. Pa stoga, upotreba eteričnih ulja u jestivim pakiranjima predstavlja najbolju opciju za daljnji razvoj ovih materijala, jer osim svih navedenih svojstava, eterična ulja mogu se upotrebljavati i kao plastifikatori jer utječu na smanjenje krhkosti i povećanje fleksibilnosti materijala (Rincon i sur., 2019).

Osim eteričnog ulja lovora i druga ulja su se pokazala kao dobra sredstva u izradi jestivih filmova. Martinez i sur. (2018) istražili su učinak jestivih premaza od kitozana koji u sastavu

sadrži različite udjele eteričnog ulja (*Thymus capitatus*) na jagode. Jagode su iznimno cijenjene u prehrambenoj industriji zbog visokog sadržaja biološki aktivnih spojeva. Međutim, smatraju se visoko pokvarljivim voćem, koje obično napadaju štetnici fitopatogenog podrijetla, što im smanjuje rok trajanja. Kako bi se umanjili gubici uzrokovani patogenim mikrobima, istražena je upotreba kitozana, polisaharida u kombinaciji s prirodnim tvarima kao što je eterično ulje. Jestivi filmovi od kitozana koji sadrže eterično ulje *Thymus capitatus* primijenjeni su na jagode pohranjene u uvjetima hlađenja ($5 \pm 0,5$ °C). Rezultati istraživanja Martinez i sur. (2018) pokazali su dobre učinke na fizička i mikrobiološka svojstva jagoda. Svi su proizvodi imali veću prihvaćenost i kvalitetu od kontrolnog uzorka bez eteričnog ulja. Značajno je da svi tretmani eteričnim uljem povećavaju rok trajanja jagoda do 15 dana. Analiza mikrostrukture skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) pokazala je smanjenje kompaktnosti filma uvođenjem eteričnog ulja timijana u njegov sastav, ali bez da se narušilo očuvanje jagoda nakon 15 dana skladištenja. Također, kod tretiranih jagoda primijećeno je da je došlo do odgode u gubitku fizikalno-kemijskih i antioksidativnih svojstava zbog zaštite od mikrobiološkog razvoja aerobnih mezofila, plijesni i kvasca.

Kako bi se smanjili negativni efekti primjene eteričnih ulja na organoleptička svojstva proizvoda eterična ulja se mogu dodavati kao nanoemulzije. No, i nanoenkapsulacija aktivnih spojeva je učinkovit je pristup povećanju fizičke stabilnosti aktivnih tvari i štiti ih od interakcije s drugim sastojcima hrane, a zbog njihove veličine, povećava njihovu bioaktivnost. Ova metoda primjene eteričnih ulja je poželjna kako bi se eterična ulja zaštitila od okolišnih faktora kao što su utjecaj kisika, svjetlost i vlaga. Također osim stabilnosti, učinkovita je u poboljšanju topljivosti uključujući i „maskiranje“ arome i jakog okusa ulja (Ataei i sur., 2020).

3.4. Antimikrobna svojstva hidrolata

Antibakterijsko djelovanje biljnih ekstrakata, uključujući hidrolate, poznato je i koristi se od davnina. Sposobnost hidrolata da kontroliraju rast mikroorganizama razlikuje se ovisno o kemijskom sastavu hidrolata i vrsti mikroorganizama na koje se djeluje. Timijan i origano spadaju u najučinkovitije biljke protiv rasta mikroorganizama. Sagdic i Toruk (2013) ispitali su sposobnost hidrolata dobivenog iz tri biljke Lamiaceae (timijan, vrisak i origano). Ispitivano je antibakterijsko djelovanje protiv soja *Escherichia coli* O157:H7 inokuliranog u svježe rezanu rajčicu i krastavce. Rezultati su pokazali da hidrolati biljaka Lamiaceae mogu biti prirodna sredstva za čišćenje hrane i da njihova upotreba neće prouzročiti oštećenja na tretiranim proizvodima ili zdravstvene probleme kod ljudi, jer su hidrolati doveli do potpune inhibicije bakterije ili do smanjenja populacije većeg od 2,50 log CFU g⁻¹. Ozturk i sur. (2016) su za kontrolu rasta *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 i *L. monocytogenes* inokuliranih u svježe rezanu iceberg salatu koristili hidrolate timijana, vrisaka, ružmarina, kadulje, očista (sideritis), origana i lovora. Rezultati su pokazali da je došlo do približno 3 log redukcije u populaciji patogena primjenom svih hidrolata. Hidrolati origana i vrisaka doveli su do najbržeg smanjenja *E. coli* O157:H7. Hidrolat timijana je bio najučinkovitiji hidrolat protiv *S. Typhimurium* i *L. monocytogenes*, zbog bogatstva timola i karvakrola, dok su hidrolati ružmarina i očista koji sadrže 1,8-cineol kao glavni spoj imali uglavnom ograničenu antibakterijsku učinkovitost. Ovo je istraživanje potvrdilo da bi se hidrolati mogli uspješno koristiti kao sredstva za dezinfekciju svježe rezane salate kako bi se osigurala njezina mikrobiološka sigurnost.

4. KONTROLA KVALITETE ETERIČNIH ULJA

Kontrola kvalitete eteričnih ulja iznimno je važna budući da industrija eteričnih ulja iz dana u dan raste i sve je više proizvođača na tržištu pa je sve učestalija pojava patvorenja eteričnih ulja. Eterična ulja koja se koriste u aromaterapijske svrhe moraju proći kroz strogu kontrolu kvalitete kako bi mogla dobiti certifikat kojim se jamči sigurnost korištenja i prisustvo farmakoloških aktivnih sastojaka. Norme i zahtjevi za kvalitetom eteričnog ulja izdaju se od strane Europske farmakopeje i AFNOR (Association Française de Normalisation)/ISO (International Organization for Standardization) norme.

Certifikat koji se izdaje sadrži podatke o:

- Latinski naziv biljke i dio biljke koji se koristio za proizvodnju eteričnog ulja
- Geografsko podrijetlo i metoda uzgoja biljke
- Kemijski sastav biljke; mora biti u skladu sa zahtjevima za kvalitetom Europske farmakopeje
- Fizikalne karakteristike eteričnog ulja kao što su boja, viskoznost, indeks loma svjetlosti i sl.

Patvoreno eterično ulje je ono ulje kod kojeg je pravo ekstrahirano eterično ulje biljke djelomično ili u potpunosti zamijenjeno nekim drugim manje vrijednim uljem ili sintetskom tvari, a nastoji se prodati na tržištu kao pravo.

Neki od načina patvorenja su:

- Upotreba organskih otapala i masnih ulja kako bi se eterično ulje razrijedilo. Od organskih otapala najčešće se koristi etanol ili heksan, a od biljnih ulja najčešće bademovo ili maslinovo ulje.
- Patvorenje eteričnih ulja sintetskim kemijskim spojevima. Najčešće je patvorenje eteričnog ulja lavande upotrebom sintetskog linaloola te upotreba 1,8-cineola kod patvorenja eteričnog ulja ružmarina i eukaliptusa. Kod sintetskih patvorina najveći problem predstavlja kiralnost spojeva pa tako sintezom nikada ne nastaje čisti spoj, već se kod takvih spojeva može naći mnogo stereoizomera.
- Patvorenje drugim manje vrijednim eteričnim uljima. Ovaj način patvorenja ne smatra se opasnim po zdravlje ukoliko se koriste prirodna i čista ulja. No, tako nastala patvorena ulja dovode potrošača u zabludu jer nemaju željeni farmakološki učinak.

- Postupak deterpenizacije eteričnih ulja. Iako proizvođačima služi za očuvanje ulja i mogućnost dužeg skladištenja jer su terpeni spojevi koji su podložni oksidaciji, ovako nastala ulja neće imati farmakološki učinak.

Patvorenje eteričnih ulja provodi se i zbog lošijeg kemijskog sastava ulja koji može nastati zbog neadekvatnih uvjeta proizvodnje i skladištenja. Neadekvatno provedene ekstrakcije, loša aparatura i neoptimizirani uvjeti ekstrakcije mogu kao posljedicu imati eterično ulje lošije kvalitete (Marković, 2005).

4.1. Analiza eteričnih ulja

Analize eteričnih ulja provede se različitim metodama, a sve u cilju osiguranja kvalitete i sigurnosti potrošača kao i pravedne trgovine eteričnih ulja (eng. *Fair trade*) koja je sve zastupljenija u svijetu. Danas je u upotrebi širok raspon fizikalno-kemijskih, organoleptičkih, kromatografskih te spektroskopskih analiza (Do i sur., 2015).

Kontrola kvalitete eteričnih ulja započinje serijom testova koji su preporučeni od strane regulatornih tijela (Europska farmakopeja i ISO). Prvi korak je senzorska analiza, koja ispituje organoleptičke svojstva proizvoda te se provodi od strane senzorskih panelista. Međutim, nedostatak ove metode je, osim što zahtjeva duže vrijeme provođenja, da se stupanj senzorske osjetljivosti osposobljenih panelista smanjuje tijekom vremena što će utjecati na osjetilnu procjenu. Drugi korak obuhvaća niz fizikalnih i kemijskih analiza. Fizikalno-kemijska svojstva koja se određuju su: određivanje estera, kiselina, karbonilni indeks, relativna gustoća, optička rotacija, određivanje točke leđišta ili vrelišta. Ovim metodama moguće je otkriti patvorenja eteričnih ulja. Tako npr. dodatkom terpentinskog ulja koji kao glavni sastojak sadrži α -pinen u eterično ulje limuna, dolazi do smanjena specifične težine te do promjene optičke rotacije. Međutim, ove jednostavne, učinkovite metode nedovoljne su kod otkrivanja više sitnih patvorenja. Tada je potrebno koristiti snažnije analitičke tehnike: plinsku kromatografiju (GC), tekućinsku kromatografiju (LC), tekućinsku kromatografiju visokih performansi (HPLC) ili nuklearnu magnetsku rezonanciju (NMR). U monografijama eteričnih ulja plinska kromatografija se preporučuje kao ključna tehnika u analizi kemijskog sastava eteričnog ulja. Povezivanje metoda plinske kromatografije i masene spektrometrije, GC-MS metoda analize (eng. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) smatra se najvažnijom metodom u identifikaciji kemijskih spojeva eteričnog ulja (Do i sur., 2015).

5. ZAKONSKA REGULATIVA ETERIČNIH ULJA

Eterična ulja su složene smjese kemijskih spojeva čija je upotreba u farmaceutskoj i prehrambenoj tehnologiji sve veća. U Republici Hrvatskoj ne postoji zakon koji se odnosi isključivo na eterična ulja. Kako se eterična ulja upotrebljavaju u različitim industrijama tako su obuhvaćena različitim zakonima. Upotreba eteričnih ulja u Hrvatskoj regulirana je: Zakonom o hrani (NN 81/13, 14/14, 30/15, 115/18), Pravilnikom o dodacima prehrani (NN 126/2013), Pravilnikom o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno (NN 160/2013). Eterična ulja regulirana su i Zakonom o kemikalijama (NN 18/13, 115/18, 37/20) jer se smatraju koncentriranom smjesom kemijskih spojeva. Za svaku kemikaliju na tržištu, pa tako i eterično ulje potrebno je ispuniti sigurnosno-tehnički list (STL) (CroLab). Sigurnosno-tehnički list osigurava iscrpne podatke o kemijskoj tvari ili smjesi koja se koristi na radnom mjestu. On osigurava i poslodavcima i radnicima uvid u podatke o kemijskoj opasnosti, uključujući i opasnost za okoliš, kao i mjere predostrožnosti. STL je izrađen prema smjernicama Uredbe (EZ) br. 1907/2006 o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i Uredbe (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP) za podnositelje zahtjeva o prirodno složenim tvarima (NCS) u koje se ubrajaju i eterična ulja (HZJZ).

6. ZAKLJUČAK

Nekoliko je zaključaka koji se mogu izvesti:

- Korištenje nekonvencionalnih metoda kao predtretmana biljnog materijala neposredno prije vodene destilacije pokazalo se učinkovito kod povećanja prinosa ili ciljanih kemijskih komponenti eteričnog ulja te je značajno skraćeno potrebno vrijeme ekstrakcije.
- Najzastupljeniji biološki aktivni kemijski spojevi u eteričnim uljima i hidrolatima su monoterpeni (1,8-cineol, linalool, α - i β -tujon, kamfor, borneol, terpineol, bornil acetat, α - i β -pinen, sabinen, α -terpinen), zatim slijede seskviterpeni (β -kadien, α -cedren, kariofilen, eudesmol, aromadendren) i fenilpropanski derivati (timol, karvakrol, eugenol, metil eugenol) dok su u kemijskom sastavu biljnih i vodenih ekstrakata najviše zastupljeni polifenolni spojevi kao što su fenolne kiseline (ferulinska kiselina, ružmarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina) i flavonoidi (kvercetin, apigenin, kamferol prisutni u obliku glikozida) te terpeniski spojevi (mono i diterpeni).
- Zbog prisutnosti velikog broja različitih reaktivnih skupina u eteričnim uljima i biljnim ekstraktima, njihovo inhibicijsko djelovanje može se pripisati specifičnom mehanizmu djelovanja ciljanih mjesta na stanici mikroorganizma.
- U vremenu kada je sve veća potražnja za funkcionalnom hranom te općenito zdravim načinom života, primjena eteričnih ulja, biljnih ekstrakata te hidrolata predstavlja veliki potencijal za daljnji razvoj prehrambenih proizvoda. Osim njihove primjene kao konzervansa, sve se više istražuje i njihova primjena u proizvodnji jestivih filmova i premaza. Biljni ekstrakti i eterična ulja imaju potencijalnu primjenu kao nova prirodna antimikrobna supstancija, koja bi se mogla dodavati u obliku ekstrakta ili eteričnog ulja u polugotovi proizvod, ili u obliku dodatka prilikom pakiranja minimalno procesiranog proizvoda. Provedenim istraživanjima, dokazano je da se implementacijom biljnih ekstrakata i eteričnih ulja u gotovi proizvod ili prilikom pakiranja postiže inhibitorno djelovanje na aktivnost mikroorganizama koji mogu rasti u širokom rasponu temperature i pH vrijednosti.
- Prednost upotrebe eteričnih ulja je što su biorazgradiva, što ih se može implementirati prilikom pakiranja hrane i time smanjiti upotrebu sintetskih proizvoda. Također,

eterična ulja u većim količinama mogu biti toksična pa je potrebno ispitati inhibitorno djelovanje pri nižim koncentracijama.

- Potrebno je istražiti preporučene dnevne unose eteričnih ulja u prehrambenoj industriji, kako bi se njihova primjena mogla regulirati te biti dio vodiča i smjernica za zdravu prehranu.
- Treba istaknuti važnost kontrole kvalitete eteričnih ulja, pogotovo u vremenu kada su sve češća patvorenja, kako bi se osigurali proizvodi visoke kvalitete i sigurnosti.

7. LITERATURA

Ainane, A., Khammour, F., Charaf, S., Elabboubi, M., Elkouali, M., Talbi, M., Benhima R., Cherroud, S., Ainane, T., (2019) Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: *Cedrus atlantica*, *Citrus limonum*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globules*. *Mater. Today: Proceedings*, **13**, 474–485.

Anonymus 1 (2019) Rast i uzgoj bilja, <https://kadulja.com/ljekovite-biljke/uzgoj-biljaka/>.
Pristupljeno: 12. rujna, 2020.

Anonymus 2 (2017) <<https://www.agroklub.com/hortikultura/samonikla-dalmatinska-kadulja-izvozni-proizvod/33437/>> Pristupljeno: 18. studenog, 2020.

Anonymus 3 (2015) <<https://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/ruzmarin-276/>>
Pristupljeno: 18. studenog, 2020.

Anonymus 4 (2020) <<https://croatia.hr/hr-HR/doziviljaji/kultura-i-bastina/unesco-starogradsko-polje>> Pristupljeno: 18. studenog, 2020.

Anonymus 5 (2020) <<https://www.gardenersworld.com/plants/thymus-vulgaris/>> Pristupljeno: 18. studenog, 2020.

Anonymus 6 (2018) <<https://www.jparkers.co.uk/6-thymus-serpyllum>> Pristupljeno: 18. studenog, 2020.

Anonymus 7 (2017) <<https://www.plantea.com.hr/lovor/>> Pristupljeno: 18. studenog, 2020.

Ataei, S., Azari, P., Hassan, A., Pinguan-Murphy, B., Yahya, R., & Muhamad, F. (2020) Essential Oils-Loaded Electrospun Biopolymers: A Future Perspective for Active Food Packaging. *Adv. Polym. Technol.* **2020**, 1-21.

Asensio, C. M., Grosso, N. R., Juliani, H. R. (2015) Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oil. *LWT.* **60**, 664–671.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**(4), 426–436.

Bajalan, I., Rouzbahani, R., Pirbalouti, A.G., Maggi, F. (2017) Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Ind. Crops Prod.* **107**, 305–311.

Bayala, B., Bassole, I.H.N., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Lobaccaro, J.M., Simpore, J. (2014) Anticancer activity of essential oils and their chemical components- a review. *Am. J. Cancer Res.* **4**(6), 591-607.

Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. (2001) St John's wort (*Hypericum perforatum* L.)- a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 583-600.

Barbosa, I. M., Medeiros, J. A. C., Oliveira, K. A. R., Gomes-Neto, N. J., Tavares, J. F., Magnani, M. (2016) Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables. *Food Control*, **59**, 468–477.

Begum A., Sandhya S., Syed Shaff ath A., Vinod K.R., Swapna R., Banji D. (2013) An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.* **12** (1), 61-74.

Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Atanasov, A. G. (2018) A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *Trends Analyt. Chem.* **100**, 82–102.

Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., Baskaran, D. (2019) Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, **2**, 49-55.

Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3(1)**, 32-47.

Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., Carvalho, J. C. T. (2019) *Rosmarinus officinalis* Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J. Ethnopharmacol.* **229**, 29-45.

Borges, R.S., Lima, E.S., Keita, H., Ferreira, I.M., Fernandes, C.P., Cruz, R.A.S., Duarte, J.L., Velázquez-Moyado, J., Ortiz, B.L.S., Castro, A.N., Ferreira, J.V., da Silva Hage-Melim, L.I., Carvalho, J.C.T. (2017) Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. *Inflammopharmacology*, **26**, 183- 195.

Bosiljkov, T., Tripalo, B., Ježek, D., Brnčić, M., Karlović, S. (2010) Princip rada i primjena visokih tlakova u prehrambenoj industriji, *Kem. Ind.* **59 (11)**, 539–545.

Bouaziz, M., Yangui, T., Sayadi, S., Dhouib, A. (2009) Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 2755–2760.

Caputo, L., Nazzaro, F., Souza, L., Aliberti, L., De Martino, L., Fratianni, F., Cappola, R., De Feo, V. (2017) *Laurus nobilis*: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. *Molecules*, **22(6)**, 930.

Castro-Puyana, M., Marina, M. L., Plaza, M. (2017) Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **5**, 31–36.

Cheng, X., Bi, L., Zhao, Z., Chen, Y. (2015) Advances in Enzyme Assisted Extraction of Natural Products. U: Proceedings of the 3rd International Conference on Material, Mechanical and Manufacturing Engineering (Yarlagadda, P., ured.), Atlantis Press, Pariz, str. 371-375.

Cutillas, A.-B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., Tudela, J. (2018) *Rosmarinus officinalis* L. essential oils from Spain: composition, antioxidant capacity, lipoxygenase and acetylcholinesterase inhibitory capacities, and antimicrobial activities. *Plant Biosyst.* **3504**, 1–11.

Conde-Hernández, L. A., Espinosa-Victoria, J. R., Trejo, A., Guerrero-Beltrán, J. A. (2017) CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *J. Food Eng.* **200**, 81–86.

(CroLab), Hrvatski laboratoriji, Eterična ulja hidrolati i biljni ekstrakti-seminar, <https://www.crolab.hr/web/60_70_404_6_-1_-1_detalj_default.aspx>. Pristupljeno: 29. rujna, 2020.

Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15(10)**, 7313–7352.

D'Amato, S., Serio, A., Lopez, C. C., Paparella, A. (2018) Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, **86**, 126–137.

Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols of Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Technol. Biotech.* **51 (1)**, 84-91.

Dent, M., Dragović-Uzelac V., Elez Garofulić I., Bosiljkov T., Ježek D., Brnčić M. (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.), *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29 (3)**, 475-484.

Diniz-Silva, H. T., Batista de Sousa, J., da Silva Guedes, J., Ramos do Egypto Queiroga, R. de C., Madruga, M. S., Tavares, J. F., Souza, E. L., Magnani, M. (2019) A synergistic mixture of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils to preserve overall quality and control *Escherichia coli* O157:H7 in fresh cheese during storage. *LWT.* **112**, 77-81.

Do, T. K. T., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S., Fernandez, X. (2015) Authenticity of essential oils. *Trends Analyt. Chem.* **66**, 146–157.

Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., Eloutassi, N. (2019) Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. *Sci. World J.* **2019**, 1–6.

Fidan, H, Stefanova G., Iliana Kostova,I., Stankov, S., Stanka Damyanova, S., Stoyanova, A., Zheljaskov, V. D. (2019) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria; *Molecules*, **24**, 804.

Galić, K. (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **4**, 23-31.

Garneau, F.X., Collin, G., Gagnon, H. (2014) Chemical composition and stability of the hydrosols obtained during essential oil production I: the case of *Melissa officinalis* L. and *Asarum canadense* L. *Am. J. Essent. Oil. Nat. Prod.* **2**, 54-62.

Grdinić V., Kremer D. (2009) Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Hrvatska ljekarnička komora, str. 19, 178, 349-350.

Grlić, Lj. (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 2.izd., August Cesavec Zagreb, Zagreb.

Hosni, K., Hassen, I., Chaabane, H., Jemli, M., Dallali, S., Sebei, H., Casabianca, H. (2013) Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Ind. Crops Prod.* **47**, 291-299.

Hulina, N. (2011) Više biljke stablašice: Sistematika i gospodarsko značenje, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.

(HZJZ) Hrvatski zavod za javno zdravstvo-Služba za toksikologiju, Ispunjavanje STL-a, <<https://www.hzt.hr/stl-deklaracije-upute/ispunjavanje-stl-a.html>>. Pristupljeno: 29. rujna, 2020.

Inouye, S., Takahashi, M., Abe, S. (2008). A comparative study on the composition of forty four hydrosols and their essential oils. *IJEOT*, **2**, 89-104.

Perino-Issartier, S., Ginies, C., Craavotto, G., Chemat, F. (2013) A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation, *J. of Chromatography A*. **1305**, 41-47.

Khan, S. A., Aslam, R., Makroo, H. A. (2018) High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review. *J. Food Process Eng.* **42**, 1-15.

Karakaya, S., El, S.N., Karagozlu, N., Sahin, S., Sumnu, G., Bayramoglu, B. (2014) Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from rosemary. *J. Food Sci. Technol.* **51**, 1056–1065.

Karampoula, F., Giaouris, E., Deschamps, J., Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E., Dubois-Brissonnet, F. (2016) Hydrosol of *Thymbra capitata* Is a Highly Efficient Biocide against *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Biofilms. *Appl. Environ. Microb.* **82(17)**, 5309–5319.

Khalili, G., Mazloomifar, A., Larijani, K., Tehrani, M. S., Azar, P. A. (2018) Solvent-free microwave extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. and *Melissa officinalis* L. *Ind. Crops Prod.* **119**, 214–217.

Kosar, M., Tunalier, Z., Ozek, T., Kurkcuoglu, M., Baser, K.H.C. (2005) A simple method to obtain essential oils from *Salvia triloba* L. and *Laurus nobilis* L. by using microwave-assisted hydrodistillation. *Z. Naturforsch C J. Biosci.* **60**, 501–504.

Kowalski, R., Wawrzykowski, J. (2009) Effect of ultrasound-assisted maceration on the quality of oil from the leaves of thyme *Thymus vulgaris* L. *Flavour Frag. J.* **24(2)**, 69–74.

Kumar, V., Mathela, C. S., Kumar, M., Tewari, G. (2019) Antioxidant potential of essential oils from some Himalayan Asteraceae and Lamiaceae species. *Medicine in Drug Discovery*, **1**, 100-104.

Lei, G., Wang, L., Liu, X., Zhang, A. (2014) Chemical composition of essential oils and hydrosols from fresh flowers of *Cerasus subhirtella* and *Cerasus serrulata* from East China. *Nat. Prod. Res.* **2**, 1923-1925.

Lucchesi, M. E., Chemat, F., Smadja, J. (2004) Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr.* **1043**, 323–327.

Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., Georgiev, M. I. (2017) Terpenoids. U: *Pharmacognosy* (Badal, S., Delgoda, R., ured.), Elsevier/AP, Poljska, str. 233-266.

Marković, S. (2005) Fitoaromaterapija, Centar cedrus, Zagreb.

Martínez, K., Ortiz, M., Albis, A., Gilma Gutiérrez Castañeda, C., Valencia, M., Grande Tovar, C. (2018) The Effect of Edible Chitosan Coatings Incorporated with *Thymus capitatus* Essential Oil on the Shelf-Life of Strawberry (*Fragaria x ananassa*) during Cold Storage. *Biomolecules*, **8**, 155.

Medina-Torres, L., Santiago-Adame, R., Calderas, F., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Bernard-Bernard, M. J., Manero, O. (2016) Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. *Ind. Crops Prod.* **90**, 1–8.

Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A., Taddese, S. (2016) In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *Int. J. Microbiol.* **2016**, 1-6.

Mešić, A., Pajač-Živković, I., Židovec, V., Krasnić, M., Čajkulić, A. (2016) Ekološka biljna proizvodnja u Hrvatskoj i njezino označavanje. *Glasilo biljne zaštite* **16(6)**, 563-577.

Miljanović, A., Bielen, A., Grbin, D., Marijanović, Z., Andlar, M., Rezić, T., Roca, S., Jerković, I., Vikić-Topić, D., Dent, M. (2020) Effect of Enzymatic, Ultrasound, and Reflux Extraction Pretreatments on the Chemical Composition of Essential Oils. *Molecules*, **25(20)**, 4818.

Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja (2020) Uzimanje (sakupljanje) iz prirode i održivo korištenje zavičajnih divljih vrsta <<https://mzoe.gov.hr/print.aspx?id=1253&url=print>>. Pristupljeno: 12. rujna, 2020.

Moradi, S., Fazlali, A., Hamedi H. (2018) Microwave-assisted hydro-distillation of essential oil from rosemary: Comparison with traditional distillation,” *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **10**, 22–28.

Muniz-Marquez, D. B., Wong-Paz, J. E., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2018) Bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis*) extracted by microwave technology. *Zeitschrift Für Naturforschung*, **73(9-10)**, 401-407.

Nieto, G. (2020) A Review on Applications and Uses of Thymus in the Food Industry. *Plants*, **9**, 961.

Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, A., Marković, T., Giweli, A., Soković, M. (2014) Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum L.*, *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris L.* essential oils. *Ind. Crops Prod.* **52**, 183–190.

Ozturk, L., Tornuk, F., Caliskan-Aydigan, O., Zeki Durak, M., Sagdiç, O. (2016) Decontamination of iceberg lettuce by some plant hydrosols. *LWT- Food Sci. Technol.* **74**, 48-54.

Pavlić, B., Teslić, N., Vidaković, A., Vidović, S., Velićanski, A., Versari, A., Radosavljević, R., Zeković, Z. (2017) Sage processing from by-product to high quality powder: I. Bioactive potential. *Ind. Crops Prod.* **107**, 81–89.

Pokos Nemec, V. (2011) Ekološka proizvodnja povrća. *Glasnik zaštite bilja* **6**, 18-28.

Posadzki, P., Alotaibi, A., Ernst, E. (2012) Adverse effects of aromatherapy: a systematic review of case reports and case series. *Int. J. Risk Saf. Med.* **24**, 147–161.

Pravilnik o ekološkoj proizvodnji u uzgoju bilja i u proizvodnji biljnih proizvoda (2001) *Narodne novine* **91**, Zagreb.

Pravilnik o dodacima prehrani (2013) *Narodne novine*, **126**, Zagreb.

Pravilnik o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno (2013) *Narodne novine*, **160**, Zagreb.

Pravilnik o sakupljanju zavičajnih divljih vrsta (2017) *Narodne novine* **114**, Zagreb.

Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J. (2012) Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol.* **30**, 37-44.

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Penić, M., Fegeš, M., Dragović-Uzelac, V. (2016) Microwave Assisted Extraction (MAE) of Dalmatian Sage Leaves for the Optimal Yield of Polyphenols: HPLC-DAD Identification and Quantification. *Food Anal. Methods* **9(8)**, 2385.

Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011) Microwave - assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* **21**: 738-745.

Rajeswara Rao, B.R. (2013) Hydrosols and water-soluble essential oils: medicinal and biological properties. Recent progress in medicinal plants. *Essential oils I*, **36**, 119-140.

Rapić, V. (2008) Postupci pripreve i izolacije organskih spojeva, Školska knjiga, Zagreb.

Rashed, M. M. A., Tong, Q., Nagi, A., Li, J., Khan, N. U., Chen, L., Bakry, A. M. (2017) Isolation of essential oil from *Lavandula angustifolia* by using ultrasonic-microwave assisted method preceded by enzymolysis treatment, and assessment of its biological activities. *Ind. Crops Prod.* **100**, 236–245.

Rasooli, I., Mirmostafa, S.A. (2002) Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia* **73**, 244–250.

Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009) Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties- an Overview. *Forsch Komplementmed.* **16**, 79-90.

Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H.S., Albuquerque, T. G., Castilho, M. C., Sanches-Silva, A. (2015) A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) *Trends Food Sci. Tech.* **45**, 355–368.

Rincon, E., Serrano, L., Balu, A. M., Aguilar, J. J., Luque, R., Garcia, A. (2019) Effect of Bay Leaves Essential Oil Concentration on the Properties of Biodegradable Carboxymethyl Cellulose-Based Edible Films. *Materials.* **12**, 2356.

Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalel, K.I., (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crops Prod.* **43**, 827–831.

Sagdiç, O., Ozturk, I., Tornuk, F. (2013) Inactivation of non-toxicogenic and toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in minimally processed tomatoes and cucumbers: Utilization of hydrosols of *Lamiaceae* spices as natural food sanitizers. *Food Control*, **30**, 7-14.

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 Microbiol.* **24**, 465-473.

Shahid, M., Yusuf, M., Mohammad, F. (2016) Plant phenolics: A Review on Modern extraction techniques, *RPMP*, **41**, 2-20.

Sik, B., Hanczke, E. L., Kapcsandi, V., Ajtony, Z. (2020) Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six *Lamiaceae* plants as determined by HPLC-DAD measurement. *J. Pharmaceut. Biomed.* **184**, 113-173.

Smigielski, 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*). *J. Essent. Oil Res.* **25**, 291-299.

Smigielski, K., Prusinowska, R., Stobiecka, A., Kunicka-Styczynska, A., Gruska, R. (2018) Biological Properties and Chemical Composition of Essential Oils from Flowers and Aerial Parts of Lavender (*Lavandula angustifolia*). *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 1–12.

Sotiropoulou, N. S., Megremi, S. F., Tarantilis, P. (2020) Evaluation of Antioxidant Activity, Toxicity, and Phenolic Profile of Aqueous Extracts of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and Sage (*Salvia officinalis* L.) Prepared at Different Temperatures. *Appl. Sci.* **10(7)**, 2270.

Spiridon, I., Colceru, S., Anghel, N., Teaca, C. A., Bodirlau, R., Armatu, A. (2011) Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Nat. Prod. Res.* **25(17)**, 1657–1661.

Sfaei-Ghomi, J., Meshkatsadat, M. H., Shamaei, S., Hasheminejad, M., Hassani, A. (2009) Chemical characterization of bioactive volatile molecules of four Thymus species using nanoscale injection method. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* **4 (4)**, 835–841.

Stratakos, A. C., Koidis, A. (2016) Methods for Extracting Essential Oils. Essential Oils. U: *Food Preservation, Flavor and Safety* (Preedy, V. P., ured.), Irish Academy Press, San Diego, str. 31-38.

Šimić, F. (1980) Naše medonosno bilje, Znanje, Zagreb.

Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B., Ehlers, B. (2003) Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem. Ecol.* **29**, 859–880.

Tornuk, F., Cankurt, H., Ozturk, I., Sagdiç, O., Bayram, O., Yetim, H. (2011) Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. *Int. J. Food Microbiol.* **148**, 30-35.

Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, **2(12)**, 1231–1246.

Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. (2002) The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1561–1568.

Uredba (EZ) br. 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća od 18. prosinca 2006. o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija (REACH) i osnivanju Europske agencije za kemikalije te o izmjeni Direktive 1999/45/EZ i stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 793/93 i Uredbe Komisije (EZ) br. 1488/94 kao i Direktive Vijeća 76/769/EEZ i direktiva Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ, 93/105/EZ i 2000/21/EZ

Uredba (EZ) br. 1272/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i Direktive 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006

Vinatoru, M., Mason, T. J., Calinescu, I. (2017) Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends Analyt. Chem.* **97**, 159–178.

Yousefi, M., Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S. M., Wysokowski, M., Jesionowski, T., Ehrlich, H., Mirsadeghi, S. (2019) Supercritical Fluid Extraction of Essential Oils. *Trends Analyt. Chem.* **118**, 182-193.

Zakon o hrani (2013) *Narodne novine*, **81**, Zagreb.

Zakon o izmjenama zakona o hrani (2018) *Narodne novine*, **115**, Zagreb.

Zakon o kemikalijama (2013) *Narodne novine*, **18**, Zagreb.

Zakon o izmjenama i dopunama zakona o kemikalijama (2020) *Narodne novine*, **37**, Zagreb.

Znaor, D. (1996) Ekološka poljoprivreda sutrašnjice, Nakladni zavod Globus, Zagreb.

Žilić I. (2014) Udžbenik za sakupljanje samoniklog jestivog bilja, Poljoprivredna zadruga Glinska Banovina, Glina, str. 10-12.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Andrea Šimac

Ime i prezime studenta