

**UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA**

**UTICAJ VEGETATIVNOG CIKLUSA BILJKE NA HEMIJSKI
SASTAV I ANTIMIKROBNU AKTIVNOST ETARSKOG ULJA
RUZMARINA (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.)**

-MAGISTARSKI RAD-

Krunić Vlatka

Podgorica, 2024.

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA

**UTICAJ VEGETATIVNOG CIKLUSA BILJKE NA HEMIJSKI
SASTAV I ANTIMIKROBNU AKTIVNOST ETARSKOG ULJA
RUZMARINA (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.)**

-MAGISTARSKI RAD-

Krunić Vlatka

Podgorica, 2024. godine

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Vlatka Krunić

Datum i mjesto rođenja:

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Osnovne studije: Hemijska tehnologija, Metalurško-tehnološki fakultet

Godina završetka studija:

INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Uticaj vegetativnog ciklusa biljke na hemijski sastav i antimikrobnu aktivnost etarskog ulja ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 05.03.2024.

Datum prihvatanja teme: 17.04.2024.

Mentor: Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Svetlana Perović, PMF, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, mentor

Prof. dr Slađana Krivokapić, PMF, član

Komisija za odbranu rada:

Prof. dr Svetlana Perović, PMF, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, mentor

Prof. dr Slađana Krivokapić, PMF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: _____, 2024.

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat:

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom „**Uticaj vegetativnog ciklusa biljke na hemijski sastav i antimikrobnu aktivnost etarskog ulja ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)**“ rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

Podgorica, 2024.godine

Potpis studenta

IZVOD

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, aromatične biljke su biljne vrste koje sadrže jednu ili više aktivnih komponenti određenog ukusa i mirisa i koje se koriste za proizvodnju parfema, kozmetičkih preparata i lijekova. Ruzmarin (*Rosmarinus officinalis*) je žbunolika zimzelena aromatična biljka, igličastih listova i svjetloplavih cvjetova koji su krhki. Etarsko ulje ruzmarina se sastoji od mnogobrojnih hemijskih supstanci od koje su neke hemijski značajne kao što su borneol, cineol, bornilacetat, kamfor, osim toga sadrži i organske kiseline, alkalioide, flavone i smole. Etarsko ulje ruzmarina se koristi zbog antioksidativnog potencijala, antiinflamatornog dejstva sve do mogućnosti poboljšanja memorije. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljaka, pa i ruzmarina, je predmet mnogih istraživanja u protekloj deceniji.

Cilj ovog istraživanja je da se ispita uticaj faze vegetativnog ciklusa na hemijski sastav etarskih ulja ruzmarina (*Rosemarinus officinalis* L.), kao i antimikrobna aktivnost etarskih ulja u različitim fazama vegetativnog ciklusa na različitim mikroorganizmima. Vegetativni ciklus biljne vrste može biti od velikog značaja za njenu upotrebu, zbog različitog procenta aktivnih supstanci u različitim fazama vegetativnog ciklusa. Neka istraživanja su pokazala uticaj vegetativnog ciklusa na sastav i prinos bioaktivnih komponenti u etarskom ulju aromatičnih biljaka.

Istraživanja u ovom radu su pokazala da je prinos etarskog ulja i sadržaj glavnih komponenata etarskog ulja ruzmarina varirao u zavisnosti od vegetativnog ciklusa. U etarskom ulju lista ruzmarina dobijenom u fazi prije cvjetanja glavne komponente su: α -pinen (17.27%), 1,8-cineol (16.87%), kamfor (11.79%), (-)-borneol (7.22%), kamfen (7.16%) i verbenon (5.07%). U etarskom ulju lista ruzmarina dobijenom u fazi cvjetanja glavne komponente su: α -pinen (16.44%), 1,8 cineol (14.02%), kamfor (11.28%), borneol (9.01%). U etarskom ulju lista ruzmarina dobijenom u fazi poslije cvjetanja glavne komponente su: α -pinen (20.39%), 1,8 cineol (14.7%), kamfen (7.86%) i borneol (5.65%). U ispitivanim uzorcima etarskog ulja ruzmarina prije cvjetanja, tokom cvjetanja, cvijetu ruzmarina i nakon cvjetanja uočeno je da je najveći sadržaj jedinjenja sa kiseonikom, a zatim monoterpenskih ugljovodonika. Najveći procenat jedinjenja sa kiseonikom je uočen u uzorku cvijeta ruzmarina (70.39%).

Etarsko ulje lista ruzmarina u različitim fazama vegetativnog ciklusa, kao i cvijeta ruzmarina, djelovalo je na sve ispitivane mikroorganizme. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se sa povećanjem količine etarskog ulja ruzmarina povećava poluprečnik zone inhibicije i da najveću osjetljivost na djelovanje etarskog ulja ruzmarina ima bakterija *Staphylococcus aureus*.

Na osnovu dobijenih rezultata evidentan je uticaj vegetativnog ciklusa ruzmarina na hemijski sastav etarskog ulja, kao i uticaj na antimikrobnu aktivnost.

Ključne riječi: ruzmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), hidrodestilacija, vegetativni ciklus, etarsko ulje, hemijski sastav, antimikrobna aktivnost.

ABSTRACT

According to the definition of the World Health Organization, aromatic plants are plant species that contain one or more active components of a certain taste and smell and which are used for the production of perfumes, cosmetics and medicines. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) is a evergreen aromatic plant and light blue flowers that are fragile. Rosemary essential oil consists of numerous chemical substances, some of which are chemically significant, such as borneol, cineole, bornylacetate, camphor, and also contains organic acids, alkaloids, flavones and resins. Rosemary essential oil is used for its antioxidant potential, anti-inflammatory effect, and even the ability to improve memory. Antimicrobial activity of essential plant oils, including rosemary, has been the subject of many studies in the past decade.

The aim of this research is to examine the influence of the phase of the vegetative cycle on the chemical composition of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), as well as the antimicrobial activity of essential oils in different phases of the vegetative cycle on different microorganisms. The vegetative cycle of a plant species can be of great importance for its use, due to the different percentage of active substances in different phases of the vegetative cycle. Some studies have shown the influence of the vegetative cycle on the composition and yield of bioactive components in the essential oil of aromatic plants.

Research in this paper showed that the yield of essential oil and the content of the main components of rosemary essential oil varied depending on the vegetative cycle. In the rosemary leaf essential oil obtained in the pre-flowering phase, the main components are: α -pinene (17.27%), 1,8-cineole (16.87%), camphor (11.79%), (-)-borneol (7.22%), camphene (7.16%) and verbenone (5.07%). In the rosemary leaf essential oil obtained in the flowering phase, the main components are: α -pinene (16.44%), 1.8 cineole (14.02%), camphor (11.28%), borneol (9.01%). In the rosemary leaf essential oil obtained in the post-flowering phase, the main components are: α -pinene (20.39%), 1.8 cineole (14.7%), camphene (7.86%) and borneol (5.65%) . In the examined samples of rosemary essential oil before flowering, during flowering, then rosemary flower and after flowering, it was observed that the highest content of compounds with oxygen and

monoterpene hydrocarbons. The highest percentage of compounds with oxygen was observed in the rosemary flower sample (70,39%).

Rosemary leaf essential oil in different phases of the vegetative cycle, as well as rosemary flower, acted on all tested microorganisms. Based on the obtained results, we can conclude that with an increase in the amount of rosemary essential oil, the inhibition radius of the zone increases and that the bacteria *Staphylococcus aureus* has the highest sensitivity to the effects of rosemary essential oil. Based on the obtained results, the influence of the vegetative cycle of rosemary on the chemical composition of the essential oil, as well as the influence on the antimicrobial activity, is evident.

Key words: rosemary (*Rosmarinus officinalis*), hydrodistillation, vegetative cycle, essential oil, chemical composition, antimicrobial activity.

Zahvalnica

Temu ovog maste rada je predložila prof. dr Biljana Damjanović- Vratnica koja je i rukovala njegovom izradom. Zahvaljujem joj se na neizmjernom strpljenju, korisnim sugestijama, savjetima i podršci tokom izrade rada.

Zahvaljujem se prof. dr Svetlani Perović i prof. dr Slađani Krivokapić na izdvojenom vremenu i sugestijama.

Želim da izrazim zahvalnost Željki Ćetković diplomiranom hemičaru, iz Centra za ekotoksikološka ispitivanja za pomoć i podršku prilikom laboratorijskog ispitivanja.

Želim da izrazim posebnu zahvalnost za podršku svojoj porodici i prijateljima.

SADRŽAJ

IZVOD	5
1. UVOD	3
2. TEORIJSKI DIO.....	5
2.1. Aromatične biljke i etarsko ulje	5
2.2. Ruzmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	8
2.3. Etarsko ulje ruzmarina (<i>Rosmarini aetheroleum</i>)	10
2.4. Farmakološko dejstvo ruzmarina i etarskog ulja ruzmarina	13
2.5. Antimikrobno dejstvo etarskog ulja ruzmarina.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. Materijal i metode	19
3.1.1. Biljni materijal	19
3.1.2. Određivanje srednjeg prečnika čestica	20
3.1.3. Izolacija etarskog ulja metodom destilacije vodenom parom (hidrodestilacija)	20
3.1.4. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS)	22
3.1.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	23
4. REZULTATI I DISKUSIJA	25
4.1. Srednji prečnik čestica ruzmarina i prinos etarskog ulja.....	25
4.2. Hemijski sastav etarskog ulja ruzmarina prije cvjetanja.....	28
4.3. Hemijski sastav etarskog ulja ruzmarina u toku cvjetanja	31
4.4. Hemijski sastav etarskog ulja cvijeta ruzmarina	35
4.5. Hemijski sastav etarskog ulja lista ruzmarina nakon cvjetanja.....	37
4.6. Uporedna analiza sadržaja jedinjenja etarskog ulja ruzmarina	39
4.7. Antimikrobna aktivnost ruzmarina.....	42
5. ZAKLJUČAK	46
6.LITERATURA	48
7.PRILOG	48

1. UVOD

Da bi se biljka svrstala u aromatične biljke, mora sadržati etarsko ulje. Etarska ulja su najčešće tečni proizvodi biljnog tkiva i veoma su specifična. Na sastav etarskog ulja mogu da utiču antropološki i ekološki faktori (geografsko područje, sastav zemljišta, vremenski uslovi itd.). Sadržaj aktivnih supstanci u etarskim uljima može da i zavisi od vegetativnog ciklusa, tj. da li je biljka se nalazi u fazi prije cvjetanja, fazi cvjetanja ili nakon cvjetanja (Yang i sar., 2023).

Proizvodnja i promet aromatičnih biljaka, u velikom broju zemalja, predstavljaju izuzetno značajne i organizovane privredne djelatnosti. Još od antičkih civilizacija postoji potraga za sredstvima koja će imati dejstvo pri liječenju, a da su prirodnog porijekla. Sa napretkom savremene nauke omogućeno je detaljno istražiti njihove hemijske komponente, biološku aktivnost i mehanizme djelovanja, sa ciljem dobijanja bezbjednijih i efikasnijih aktivnih komponenti (Oalđe Pavlović, 2022). Tržište aromatičnim biljkama uključuje promet začina, aroma i etarskih ulja. Promet ovih materija se u zemljama Evrope udvostručio u odnosu na prošli vijek. Ovakav porast je i posledica jačanja ekološke svijesti i saznanja o čestim neželjenim posledicama upotrebe proizvoda sintetske hemije (Dhouibi i sar., 2023).

Ruzmarin (*Rosmarinus officinalis*) je zimzelena biljka u obliku žbuna, sa igličastim listovima i svjetloplavim cvijetovima koji su krhki. Pripada biljkama porodice *Lamiaceae*, odnosno usnaticama. Period cvjetanja je od marta do maja a ponekad cvjeta i u septembru. Raste na priobalnom području Mediterana, ali je kultivisana u svim krajevima svijeta (Stevanović, 1995; Barak i sar., 2023). Najzastupljenija je upotreba cvijeta ruzmarina, mada se sakupljaju i listovi ruzmarina. (Al-Sereiti i sar., 1999).

Listovi ruzmarina se obično sakupljaju u fazi cvjetanja biljke i suše se pažljivo da ne bi došlo do promjene boje. Biljnu drogu predstavlja osušen list samoniklog ili gajenog ruzmarina. Može se reći da se i veza između biljke i spoljne sredine ostvaruje putem etarskih ulja. Za ruzmarin je poznato da se biosinteza etarskih ulja odvija samo u strukturama koje su u fazi razvića, odnosno u juvenilnim listovima (Hendel i sar., 2019). Da bi se dobilo etarsko ulje ruzmarina potrebno je izvršiti destilaciju lista ili vršnih djelova biljke, svježe ili prosušene. Etarsko ulje izolovano iz

ruzmarina je bistra lako pokretljiva tečnost, bezbojna ili žutozelene boje, ljutog i pomalo gorkog ukusa, specifičnog aromatičnog mirisa. Na vazduhu se lako zgusne i usmoli (Kovačević, 2004).

Ispitivanje sekundarnih metabolita aromatičnih i ljekovitih biljaka se posljednjih decenija intenziviralo, zbog brojnih prednosti ovih jedinjenja u odnosu na sintetičke agense ali i zbog činjenice da se potrošači sve više vraćaju prirodnim proizvodima. Procjenjuje se da se danas preko $\frac{3}{4}$ svjetske populacije oslanja na primjenu biljaka i ljekovitih preparata na njihovoj bazi, u samomedikaciji, prevenciji ili tretiranju blagih simptoma bolesti (Svjetska zdravstvena organizacija, 2002). Danas je velika pažnja usmjerena ka istraživanju etarskih ulja, biljnih produkata koji pokazuju značajnu biološku aktivnost. Etarsko ulje ruzmarina sadrži cineol, borneol, bornilacetat, kamfor i kamfen, alkaloida, organske kiseline, flavone, smole (Svoboda i sar., 2000). Ekstrakti i etarsko ulje ruzmarina se tradicionalno koriste kao biljni lijek za simptomatsko ublažavanje dispepsije i blagih poremećaja crijeva. Takođe, etarsko ulje ima upotrebu kao pomoćno sredstvo za ublažavanje msvjetskaanjih bolova u mišićima i zglobovima i kod manjih poremećaja periferne cirkulacije (Kovačević, 2004).

Količina etarskog ulja u ruzmarinu varira tokom životnog ciklusa biljke. Ove promjene su obično povezane sa odbrambenom ulogom etarskog ulja, tj. najčešće je najveća količina ulja u listu ruzmarinu onda kad je biljka najosjetljivija. Poznato je i da sadržaj monoterpena i seskviterpena u listu ruzmarina opada sa starošću biljke (Stević, 2013).

Predmet istraživanja ove master teze je ispitivanje uticaja vegetativnog ciklusa, odnosno vremena branja ruzmarina (prije cvjetanja, u periodu cvjetanja i nakon cvjetanja) na hemijski sastav etarskog ulja ruzmarina i njegovo antimikrobno dejstvo.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Aromatične biljke i etarsko ulje

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, aromatične biljke su biljne vrste koje sadrže jednu ili više aktivnih komponenti određenog ukusa i mirisa i koje se koriste za proizvodnju parfema, kozmetičkih preparata i lijekova. (Svjetska zdravstvena organizacija, 2002)

Ljekovitim biljkama se podrazumijevaju biljke čiji jedan ili više dijelova sadrži biološki aktivne materije, koje se mogu koristiti ili u terapijske svrhe ili za farmaceutske i hemijske sinteze. Aromatične biljke i ljekovite biljke se u novijoj literaturi može naći pod zajedničkim nazivom ljekovito bilje (Skorup, 2024).

Aktivne komponente ljekovitih biljaka se dijele na primarne i sekundarne. Primarne aktivne komponente su one komponente koje su biljci potrebne za rast i razvoj. U primarne metabolite ubrajamo proteine i aminokiseline, masne kiseline, ugljene hidrate i nukleinske kiseline. Ugljeni hidrati se na osnovu molekulske težine dijele na monosaharide, disaharide i polisaharide.. Aminokiseline su sastavni dio proteina i kao takve imaju važnu ulogu u formiranju ćelija, ali i u fiziološkim procesima biljaka. Sa druge strane sekundarne aktivne komponente nastaju direktno u biljci, i često se nazivaju bioaktivnim supstancama. Biljke biosintetišu i skladište masne kiseline u svom sjemenu, uglavnom u obliku triacil glicerola i služe im kao energetski resurs za razvoj. Nukleinske kiseline, odnosno njihov metabolizam je osnovni proces u svim živim organizmima jer nukleotidi funkcionišu kao snabdjevači energije, signali i gradivni elementi za nukleinske kiseline, kao i biljni hormon citokinin (Micić i sar., 2021). U sekundarne (bioaktivne) supstance ubrajaju se lipidi (masti i ulja uključujući i eterična ulja), lipoidi (voskovi, fosfolipidi, steroidi, masni alkoholi, karotenoidi), glikozidi (saponini, kumarini, antrakinoni, hidrokinoni), gorke supstance (amara), ljute supstance (acria), alkaloidi, vitamini itd. Primarni metaboliti ne ispoljavaju farmakološko dejstvo, već sekundarni metaboliti. (Šilješ i sar., 1992).

Aromatične biljke najčešće pripadaju porodicama: *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Lauraceae* i druge. Čovjek je od davnina upotrebljavao ove biljke za lijek, kao začim, za izradu kozmetičkih preparata i u razne druge svrhe. Sama upotreba i farmakološko djelovanje aromatičnih biljaka, potiče od prisustva etarskog ulja. Blagotvorno dejstvo etarskih ulja uopšteno

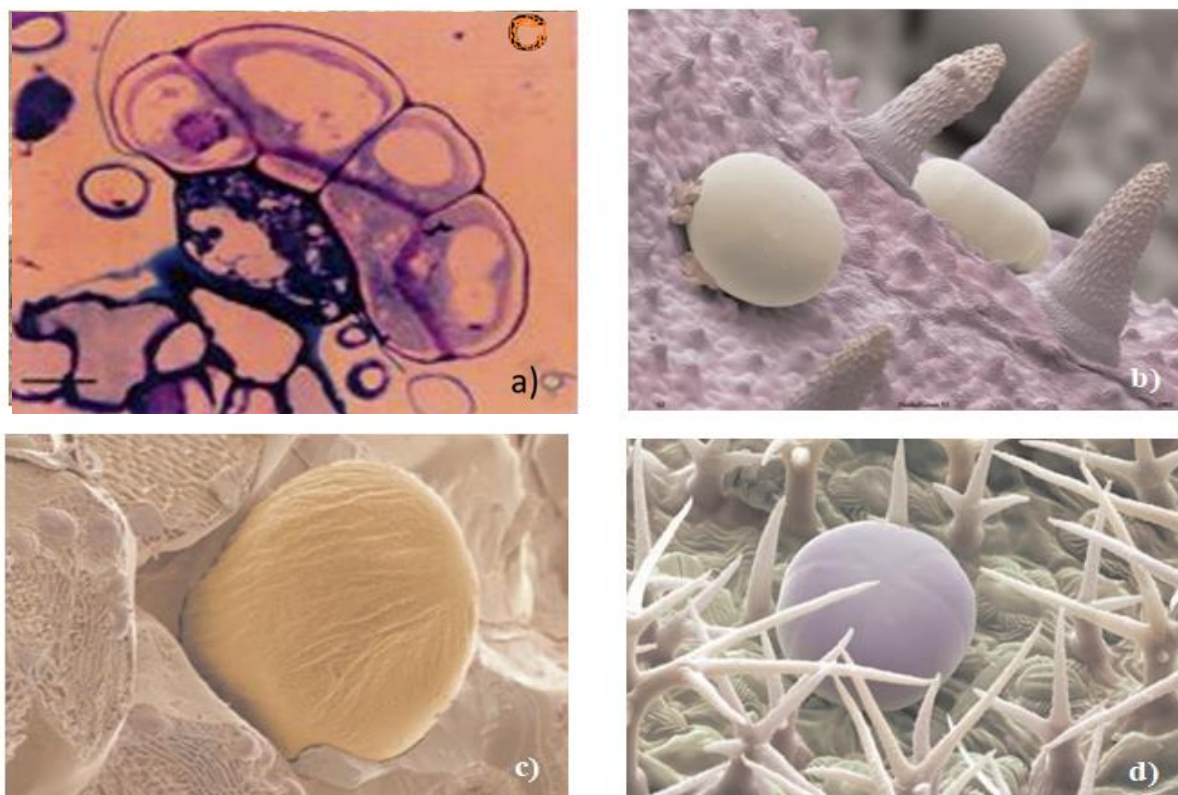
poznavali su još stari narodi i svestrano ih primjenjivali za otklanjanje mnogih tegoba. Glavno svojstvo aromatičnih biljaka i etarskih ulja jeste miris (Christopoulou, 2021). Zahvaljujući mirisu dolazi do nadražaja nervnih ćelija u osjetljivoj sluzokoži nosne duplje i izazivanja različitih sekundarnih efektata kao što su stimulacija rada srca, opuštanje glatke muskulature (Jančić i sar., 1995). Samoniklo ili kultivisano ljekovito bilje se zbog sadržaja biološki aktivnih komponenti može upotrebljavati za liječenje ljudi i životinja.

Etarska ulja su najčešće isparljive i mirišljave tečnosti, rjeđe imaju viskoznu ili polučvrstu konzistenciju. Etarska ulja su uglavnom pokretljiva, bezbojna do slabo obojena, bistra. Ne rastvaraju se u vodi već u organskim rastvaračima i alkoholu i na sobnoj temperaturi su u tečnom stanju (Rančić, 2004). Etarska ulja su podložna oksidaciji, i prilično su osjetljiva, pa ih je potrebno čuvati u hermetički zatvorenim posudama, na tamnom mjestu. U biljkama se etarsko ulje najčešće nalazi u slobodnom obliku, ali može biti prisutno i u formi glikozida. Etarsko ulje u biljci nije raspoređeno ravnomjerno. Etarsko ulje može da bude lokalizovano u različitim djelovima biljke, kao što je korijen, stablo, list ili cvijet (Chetehouna i sar., 2014). Najveća koncentracija etarskih ulja u nadzemnim organima je pred samo cvjetanje, a u podzemnim organima u fazi mirovanja. Hlađenjem nekih etarskih ulja izdvajaju se čvrsti sastojci – stearopteni ili biljni kamfori. Tečni dio etarskog ulja se naziva eleopten (Jančić, 2004).

Generalno, etarska ulja se sastoje od hemijskih jedinjenja koja u sebi sadrže vodonik, ugljenik i kiseonik, kao svoje osnovne gradivne jedinice. Ona se dalje mogu podijeliti u dvije grupe: ugljovodonici (oni su sastavljeni skoro u potpunosti od terpena i mogu biti mono-, seskvi- i di-terpeni) i jedinjenja sa kiseonikom (uglavnom su to estri, aldehidi, ketoni, alkoholi, fenoli i oksidi, a ponekad su prisutne i kiseline, laktoni, sumporna i azotna jedinjenja). Pomenuta jedinjenja se mogu naći u etarskim uljima u različitim količinama (Jančić, 2004).

Komponente etarskih ulja su uglavnom netoksične, međutim pojedine komponente etarskih ulja mogu izazvati neželjene efekte ukoliko se koriste u većoj količini, kao na primjer eugenol koji je citotoksičan i znatno smanjuje sadržaj glutaciona u hepatocitima (Boutekedjiret i sar., 1999).

Žlezdane dlake mogu biti: peltatne, kapitatne i biserijatne, na slici 1 prikazane su sekretorne strukture na primjerima nekoliko aromatičnih biljaka.



Slika 1. Sekretorne strukture: a) peltatne gladularne trihome ruzmarina, b) žljezdane dlake (peltatne dlake) na listu nane, c) sekretorna ćelija đumbira (idioblast), d) peltatna dlaka na listu lavande (Marin i sar., 2006; Christaki i sar., 2012)

Do sada je opisano više od 300 komponenti etarskog ulja (Stević i sar., 2014). To je kompleksna mješavina lipofilnih, tečnih, mirisnih i isparljivih komponenti lociranih u sekretornim strukturama aromatičnih biljaka, svrstavaju se u pet klasa:

- Terpenoidi (mono- i seskviterpeni);
- Alifatične i aromatične isparljive komponente (derivati benzojeve kiseline, fenilpropanoidi i kumarini);
- Supstance koje sadrže azot (indolni derivati i alifatični amini) (González-Minero, 2020);
- Supstance koje sadrže sumpor (izosulfocijanati i organski disulfidi);
- Kompleksna neisparljiva jedinjenja u obliku seskviterpenskih laktona jedinjenja u oblicima glikozida, iridoida ili seskviterpenskih laktona (Phillipson, 2001).

Postoje razni faktori koji mogu uticati na sastav etarskog ulja, a neki od najznačajnijih su: genotip (u ovom slučaju produkcija etarskog ulja je genetski definisana), fenofaza ontogenetskog razvoja (vrijeme prikupljanja materijala), ekološki faktori (temperatura, vlažnost, karakteristike zemljišta, nadmorska visina, klima itd.), od značaja je i kako se obrađuje svježi biljni materijal ali i način izolovanja etarskog ulja (Stanojević i sar., 2021). Aktivnost etarskog ulja zavisi od zastupljenosti hemijski aktivne komponente. Sve ovo ukazuje i na značaj faze vegetativnog ciklusa kada je prikupljen uzorak od kojeg će se dobiti etarsko ulje odgovarajućom metodom (Chetehouna i sar., 2014).

Evropska farmakopeja propisuje da se identifikacija etarskog ulja vrši pomoću gasne hromatografije, pri čemu je neophodno iz gasno hromatografskog profila odrediti minimalno 12 komponenti, a klasifikacija etarskog ulja ruzmarina se vrši na osnovu sadržaja najzastupljenijih komponenti (Ph. Eur VI, 2007).

2.2. Ruzmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ruzmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), porodica Lamiaceae, je višegodišnji zimzeleni, razgranati i aromatični žbun (slika 2a). Grane koje su uspravne, mogu biti visoke do 2 m, a nekada mogu biti polegnute i mrke kore (Kovačević, 2004). Listovi se nalaze na kratkim drškama i naspramni su, dugi do 3,5 cm, kožasti, tamno zelene boje na licu, a svjetliji na naličju. Po 5-10 cvjetova je sakupljeno u cimoznim cvastima, u pazuhu listova bočnih izdanaka. Krunica je plavoljubičasta, rjeđe bijele boje (slika 2b). Plod je merikarp, sastavljen od četiri orašice.

Ruzmarin je karakterističan po makijama koje obrazuje u Sredozemlju. Domestikacijom i oplemenjivanjem ove biljke nastalo je više od 20 genotipova. U kontinentalnom dijelu se gaji kao ukrasna biljka u baštama, a gaji se i za dobijanje biljne droge (Kovačević, 2004).



Slika 2. a) List ruzmarina; b) Ruzmarin u fazi cvjetanja (Kovačević, 2004)

Rosmarinus officinalis L. (*R. officinalis*) je važna industrijska kultura. Njegove divlje populacije rastu prvenstveno u zapadnom regionu Sredozemnog basena (Ahmed & Babakir-Mina, 2020). *R. officinalis* se od davnina koristio u razne svrhe kao što su kulinarske, medicinske i ukrasne. U oblasti nauke o hrani, ali i farmakologiji i kozmetologiji, ruzmarin je poznat po svom etarskom ulju.

Ruzmarin je biljka često pominjana i u mitologiji. U antičkim vremenima Egipćani su stavljali ruzmarin u grobove i koristili ga prilikom mumificiranja. U staroj Grčkoj ruzmarin je bio posvećen Afroditi, boginji ljepote, ali i boginji mudrosti Ateni (Bojanin, 2012). Ruzmarin se smatra simbolom energije i životne radosti. Njemački ljekar i sveštenik Sebastijan Knajp, koji je jedan od začetnika fitoterapije, tokom 19. vijeka preporučivao je starijim osobama kupke od ruzmarina kao efikasno sredstvo protiv opšte slabosti, srčanih poremećaja nervnog porijekla, fizičkog napora, kao i za upotrebu kod reumatizma i paralize, obzirom da aktivni sastojci iz ruzmarina poboljšavaju cirkulaciju i ublažavaju grčeve (Genena i sar., 2008).

U narodnoj medicini u širokoj upotrebi je čaj ruzmarina. Za pripremu čaja se koristi 30 g usitnjenog lista ruzmarina u litri vode, gdje odstoji 2-3 sata, potom je potrebno procijediti čaj. Čaj se koristi se 2-3 puta dnevno prije jela jer podstiče stvaranje želudačnih sokova. Tinktura ruzmarina se priprema sa 2 kašike lišća i cvijeta u jednom litru 60% alkohola, nakon čega stoji 10 dana i zatim se filtrira. Preporučuje se uzimanje 6-10 kapi tinkture na kocki šećera prije jela (Dobran, 2017).

Upotreba začina stara je koliko i istorija ljudskog roda. Oni su imali istaknutu ulogu u svim antičkim civilizacijama, u staroj Kini i Indiji, Vavilonu i Egiptu, Grčkoj i Rimu. Većina začina

potiče od tropskih predjela Azije, a bili su i prva roba kojom se trgovalo između Istoka i Zapada. Etarsko ulje ruzmarina, osim kao začín koristi se i kao zaštitno sredstvo (Alavi i sar., 2021). Korišćenje začina u medicini, obično se nije moglo razdvojiti od njihove upotrebe u kulinarstvu, naročito u srednjem vijeku, kada su apotekari propisivali trave i začine ne samo za ublažavanje digestivnih problema nego i za sve bolesti

Ruzmarin se ne može smatrati hranom, zbog male hranljive vrijednosti, ali se dodaje jelima ko začín, zbog ukusa i mirisa, kao i dekorativno. U upotrebi je najviše list ruzmarina, koji zahvaljujući intenzivnom mirisu koji štiti od bakterija u hrani, posebno u ljetnjim mjesecima, zahvaljujući antimikrobnom djelovanju, i suzbija širenje patogenih mikroorganizma. Zovu ga i prirodnom zamjenom za aspirin zbog svog dejstva na nervni sistem. Ruzmarin spada u tvrde začine, a njegovi tvrdi listovi skidaju se s grančice i koriste u jelima koja se duže kuvaju, posebno mesom i krompirom. Miris ruzmarina djeluje osvježavajuće, podstiče raspoloženje kod čovjeka, a često se koristi i kao dodatak pićima.

Analiza sadržaja prirodnih mirisa omogućila je vještačku sintezu novih mirisnih materija, ali i proed toga miris aromatičnih biljaka i dalje je finiji i diskretniji od onog stvorenog u laboratorijama (Jančić i sar., 1995).

List ruzmarina je bogat vitaminima i mineralima, dok mu je i hranljiva vrijednost na zavidnom nivou. Bogat je dijetetskim vlaknima, odnosno u 100g sadrži 14 g vlakana. Obiluje elementima, manganom, kalcijumom, gvožđem, bakrom i magnezijumom, a od vitamina C, A, te folnom i pantenonskom kiselinom (Kendić, 2012).

2.3. Etarsko ulje ruzmarina (*Rosmarini aetheroleum*)

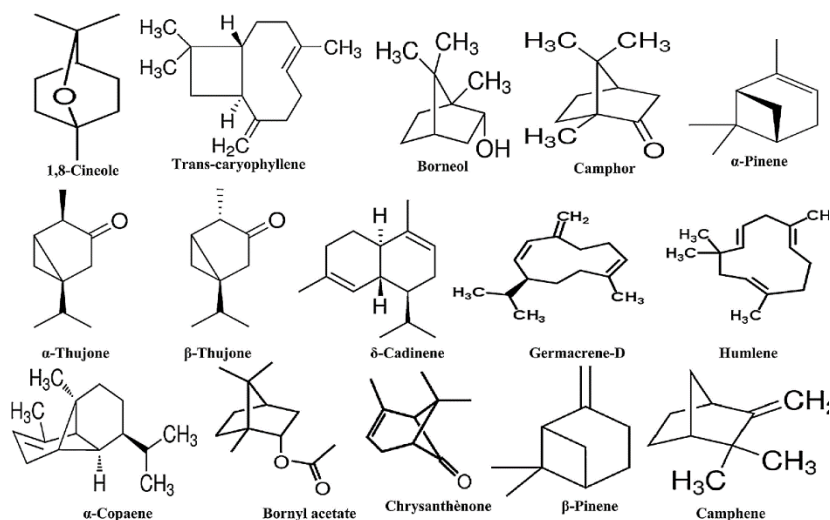
Etarsko ulje ruzmarina (lat. *Rosmarini aetheroleum*) (ROEO) dobija se destilacijom biljne droge, svježeg lista ili vršnog djela biljke u cvijetu. Etarsko ulje se najčešće dobija postupkom hidrodestilacije koja predstavlja jednostavnu i ekonomičnu metodu za preradu velike količine biljne droge (Zhang i sar., 2021). Drogu predstavlja osušen list samoniklog ili gajenog ruzmarina. Listovi se najčešće sakupljaju u fazi cvjetanja biljka, suše se pažljivo da ne bi došlo do promjene boje (Kovačević, 2004). Etarsko ulje ruzmarina je bistra lako pokretljiva tečnost, bezbojna ili

žutozelene boje, ljutog i nagorkog ukusa, specifičnog aromatičnog mirisa. Na vazduhu se lako zgusne i usmoli (Moliner i sar., 2020),

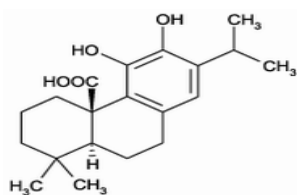
Koristi se kao dodatak hrani, ali su i farmakološke aktivnosti ROEO su dokumentovane u različitim istraživanjima koja su se bavila vrstama sa mediteranskog područja ali i uopšte na teritoriji Evrope (Posadas i sar., 2009). Prema ovim studijama ROEO, između ostalog, posjeduje značajne antimikrobne, antioksidativne, antiinflamatorne i antitumorske aktivnosti. Uprkos dokazanom farmakološkom djelovanju etarskog ulja ruzmarina, najveću primjenu i dalje ima u proizvodnji kozmetičkih sredstava, mirisa i konditorskih proizvoda (Boutekedjiret i sar., 1999; Anastassakis, 2022).

Hemijski sastav ruzmarina se uglavnom ogleda u hemijskom sastavu lista. Ruzmarinov list obično sadrži od 1,2% do 2,5% etarskog ulja. Droga takođe sadrži diterpenoide uključujući karnozol (0.35%) i karnozolnu kiselinu, te druge komponente koje podliježu procesu oksidacije pri ekstrakciji ulja (Damjanović, 2000). Etarsko ulje ruzmarina je bezbojna ili blijedo žuta pokretna tečnost sa jakim, miris mu je svjež mento-zemljasti. Ulje lošeg kvaliteta se prepoznaje po jakoj kamfornoj noti. Dobro se kombinuje sa uljima lavande, citronele, origana, timijana, bora, bosiljka, pepermint, cimeta i drugim začinskim uljima (Chetehouna i sar., 2014). Na slici 3a su prikazane strukture nekih komponenata u etarskom ulju ruzmarina.

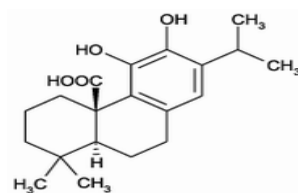
Ruzmarinovo lišće, osim etarskog ulja, sadrži ruzmarinsku kiselinu (kavenu kiselinu), flavonoide (uključujući genkvanin, luteolin i diosmetin) i njihove glikozide (genkvanin-4'-O-glukozid), triterpenske kiseline (5% derivata ursolne kiseline), triterpenske alkohole (betulin, amirine) i steroide (Ivanović i sar., 2009). Slika 3b prikazuje strukturne formule nekih komponenti koje ulaze u sastav lišća ruzmarina.



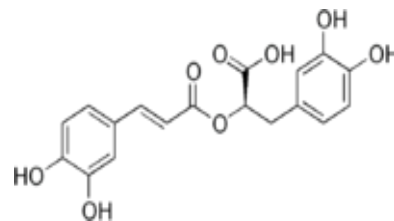
Slika 3a. Strukturalni prikaz nekih od komponenti etarskog ulja biljke *Rosmarinus officinalis* L. (Jančić, 1995)



Karnozol



Karnozolska kiselina



Ruzmarinska kiselina

Slika 3b. Strukturne formule nekih komponenti koje ulaze u sastav lišća ruzmarina (Jančić, 1995)

Najzastupljeniji sastojci etarskog ulja ruzmarina su monoterpeni 1,8-cineol, kamfor i α -pineni i na osnovu njihovog odnosa određuje se hemotip etarskog ulja ruzmarina. (Ph.Eur VII, 2010).

U Marokansko-Tunižanskom hemotipu ulja, odnos jedinjenja je: 1,8-cineol (38-55%), α -pinen (9-14%) i kamfor (5- 15%); dok su u Francusko-Španskom hemotipu najzastupljeniji α -pinen (18-26%) i 1,8-cineol (16-25%), a potom kamfor (13-21%) (Milanović, 2015)

2.4. Farmakološko dejstvo ruzmarina i etarskog ulja ruzmarina

Upotreba biljaka je stara koliko i čovječanstvo, mada se najveći značaj iskazuje u protekloj deceniji kada se ljudi okreću od vještačkih supstanci u potrazi za prirodnim. Prirodni proizvodi nisu u potpunosti bezbjedni, na šta treba obratiti pažnju, ali se smatraju sigurnijim od sintetičkih proizvoda. Takođe mogu biti pogodna sirovina za proizvodnju novih sintetičkih supstanci. Koristi se kao hrana, piće, kao i u kozmetici dok se u narodnoj medicini koristi kao antispazmolitik kod bubrežnih kolika i dismenoreje, za ublažavanje respiratornih smetnji ali i poboljšanje rasta kose (Al-Sereiti, 1999).

Antiinflamatorno djelovanje etarskog ulja ruzmarina je ispitivano na životinjskim laboratorijskim modelima. Smanjenjem migracije leukocita i eksudacije, etarsko ulje smanjuje edem šapa pacova izazvan karagenanom, jednom od aditiva koji se stavlja u hranu (de Melo, 2011). Tokom *in vitro* ispitivanja na humanim monocitima, 1,8-cineol je inhibirao stvaranje citokina i arahidonske kiseline, pa je najvjerojatniji mehanizam antiinflamatornog djelovanja etarskog ulja ruzmarina inhibicija metaboličkih puteva arahidonske kiseline (Takaki, 2008). Antiinflamatorno djelovanje etarskog ulja ruzmarina potvrđeno je i na eksperimentalnom modelu kolitisa pacova, izazvanog primjenom trinitrobenzensulfonske kiseline (de Melo, 2011).

Mehanizmi kojima etarska ulja inhibiraju ili zaustavljaju rast mikroorganizama, uključuju različite oblike djelovanja, koji se velikim dijelom zasnivaju na hidrofobnosti samih ulja i komponenti. Ugrađuju se u lipidne slojeve membrane bakterijskih ćelija i mitohondrija i prave ih više propustljivim. Čulina (2018) je ispitivao antibakterijsko djelovanje ruzmarina, origana i žalfije. Etarska ulja su pokazala antimikrobnu aktivnost prema svim ispitanim bakterijama. Dokazano je da su Gram-pozitivne bakterije znatno osjetljive na etarsko ulje origana dok je rast Gram-negativnih bakterija značajnije inhibiran etarskim uljem žalfije. Utvrđeno je i da dodatkom etarskog ulja ovih biljnih vrsta (najčešće inkapsuliranog oblika) povećava se propustljivost membrane patogena, i samim tim smanjuje njihov štetni efekat.

Monografija Evropske Medicinske Agencije (Community herbal monograph on *Rosmarinus officinalis* L., *aetheroleum*, 2022), na osnovu pozitivnih iskustava, daje preporuku za upotrebu etarskog ulja ruzmarina i čaja od ruzmarina za ublažavanje grčeva problema i kod problema sa varenjem, kao i kod dispepsije, dok se kod spoljne upotrebe preporučuje kao dodatak

kupkama za smanjenje bolova u kostima i mišićima. Međutim, ružmarin se ne preporučuje za djecu mlađu od 12 godina kao ni kod trudnica (osim kao začim u ishrani). Preporučene doze za upotrebu treba poštovati, jer su moguće nuspojave u vidu mučnine ili povraćanja. Utvrđeno je da etarsko ulje ružmarina u organizmu omogućava elektronski transport, translokaciju protona i oksidativnu fosforilaciju. Djeluje blago sedativno na centralni nervni sistem, snižava krvni pritisak, inhibira aktivnost acetilholina (Mihajlov, 1975; Rahbardar, 2020).

Kako je Milanović (2015) navela u svom istraživanju, etarsko ulje ružmarina ispoljava analgetičko djelovanje. Etarsko ulje ružmarina ne utiče značajnije na oralnu biološku raspoloživost paracetamola. Milanović (2015) dalje navodi i da višekratna primjena različitih doza etarskog ulja ružmarina ne izaziva toksične promjene u krvi i jetri ispitivanih životinja. Primjena etarskog ulja ružmarina štiti životinje od reaktivnih kiseoničnih vrsta, umanjuje posledice izloženosti oksidativnom stresu i ispoljava značajno hepatoprotektivno djelovanje. Terpenski sastojci djeluju na enzimske sisteme koji omogućuju elektronski transport, translokaciju protona i oksidativnu fosforilaciju. Sa sigurnošću je utvrđeno da su na njihovo dejstvo mnogo osjetljivije enzimske strukture dijelom povezane sa ćelijskom membranom, nego izolovani enzimski sistemi (Kojić, 2009).

Ekstrakt ružmarina opušta glatke mišiće traheje i crijeva, ima holeretičko, hepatoprotektivno i antikancerogeno dejstvo. Najvažniji sastojci ružmarina su kofeinska kiselina i njeni derivati kao što je ružmarinska kiselina (Lešnik i sar., 2021). Ova jedinjenja imaju antioksidativni efekat. Fenolno jedinjenje, ružmarinska kiselina, dobija jedan od svojih fenolnih prstenova od fenilalanina preko kofeinske kiseline, a drugi od tirozina preko dihidroksifenil-mliječne kiseline. Relativno veliki prinos ružmarinske kiseline može se dobiti iz ćelijske kulture *Coleus blumei* Benth. kada se egzogeno snabdijeva sa fenilalaninom i tirozinom (Mohamed i sar., 2022). Ružmarinska kiselina se dobro apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta i kože. Povećava proizvodnju prostaglandina E2 i smanjuje proizvodnju leukotriena B4 u humanim polimorfonuklearnim leukocitima i inhibira sistem komplementa. Zaključeno je da ružmarin i njegovi sastojci, posebno derivati kafeinske kiseline kao što je ružmarinska kiselina, imaju terapijski potencijal u liječenju ili prevenciji bronhijalne astme, spazmogenih poremećaja, peptičkog ulkusa, upalnih bolesti, hepatotoksičnosti, ateroskleroze, ishemijske bolesti srca i katarakte (Mohamed i sar., 2022).

Najvažnije komponente ruzmarina, koje su medicinski i farmakološki aktivne, su ruzmarinska kiselina, karnozična kiselina i etarsko ulje (Mohamed i sar., 2022). Ova jedinjenja su potencijalni prirodni lijekovi u liječenju patoloških stanja nervnog sistema uključujući anksioznost, depresiju, Alchajmerovu bolest, epilepsiju, Parkinsonovu bolest i sindrom povlačenja. Mohameda i saradnicu (2022) su posebno proučavali dejstvo 1,8-cineola, bioaktivnog jedinjenja u ulju ruzmarina koje mu daje aromu. Ovo jedinjenje djeluje gotovo na isti način kao i lijekovi koji se koriste za liječenje demencije - povećava aktivnost glavnog neurotransmitera acetilholina, a koji je najviše odgovoran za učenje, pamćenje i buđenje. Studija u kojoj su dobrovoljci udisali različite količine 1,8-cineola dok su radili zadate zadatke je pokazala da se udisanjem ovog hemijskog jedinjenja brže i tačnije rješavaju kognitivni testovi (Mohamed i sar., 2022). Utvrđeno je da lijekovi ili biološki aktivna supstanca iz aromatičnih biljaka imaju najbolji efekat kada se udahnu. Kada se proguta lijek, on se razgrađuje u jetri (koja prerađuje sve što apsorbuju crijeva), ali kada se udahne, mali molekuli prolaze u krvotok i stižu do mozga, a da se prethodno ne razgrade (Martinez i sar., 2012).

Studije o biljnim lijekovima su veoma važne, između ostalog da dodatno rasvijetle bezbjednost i efikasnost biljnih lijekova. Zato su neophodna i dodatna ispitivanja za procjenu bezbjednosti i efikasnosti sastojaka ruzmarina u liječenju različitih poremećaja nervnog sistema (Khatoon i sar., 2021). Štaviše, vjerovatne mehanizme djelovanja i potencijalna antagonistička i sinergistička svojstva višekomponentnih mješavina ruzmarina treba ispitati integracijom fizioloških, farmakoloških, bioraspoloživih i farmakokinetičkih metoda (Jančić i sar., 1995). Tako je u ispitivanju koje su izvršili Rahbardar i saradnici (2020) utvrđeno da ruzmarin pomaže kod nervnih problema, i da se iz ovog razloga sve više koristi širom svijeta. Nova otkrića mogu ukazati na još značajniji terapijski značaj ruzmarina i razviti njegovu buduću upotrebu u savremenoj medicini. Međutim, treba izbjegavati produženu upotrebu visokih doza tradicionalnih formulacija ruzmarina i njegovih aktivnih sastojaka dok ne postanu dostupna detaljnija ispitivanja toksičnosti (Perković, 2023).

2.5. Antimikrobno dejstvo etarskog ulja ruzmarina

Etarsko ulje ruzmarina se koristi zbog antioksidativnog potencijala, antiinflamatornog dejstva pa do mogućnosti poboljšanja memorije. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljaka, pa i ruzmarina, je predmet mnogih istraživanja u protekloj deceniji (Lužaić, 2023). Carstvo biljaka pruža veliki broj supstanci koje djeluju kao antimikrobni agensi (Lunić, 2023). Primjena ovih sastojaka u terapijske svrhe zavisi od mnogo činitelja. Ovi sastojci se generalno koriste rjeđe jer su pronađene druge komponente sa snažnijim dejstvom. Za sada, biljni lijekovi se koriste, uglavnom, kao antiseptici i za profilaksu infektivnih bolesti. Za ovakve namjene, njihova primjena može da ima sasvim zadovoljavajući terapijski efekat. Fenolne kiseline i flavonoidi su sastojci etarskog ulja ruzmarina koji pokazuju antimikrobno dejstvo (Kovačević, 2004).

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja odvija se preko tri mehanizma:

- Blokiranjem sinteze ćelijskog zida;
- Blokiranjem aktivnosti enzima koje su dio metaboličkih procesa;
- Sprječavanjem difuzije;

Blokiranjem sinteze i funkcije nukleinskih kiselina i važnih proteina (Dorman & Deans, 2000).

Rade se određena specifična ispitivanja prirodnih proizvoda, pored uobičajenog ispitivanja antimikrobnog potencijala biljnih ekstrakata. Najveći antimikrobni efekat ispoljavaju fenoli koji su uglavnom zastupljeni sa najvećim procentom u etarskom ulju, zatim slede alkoholi, aldehidi, ketoni, etri, dok je antibakterijski efekat ugljovodonika vrlo nizak (Kovačević, 2004; Dorman & Deans, 2000). Iz biljaka se izoluju bioaktivne komponente, sa antimikrobnom aktivnošću, i zatim se hemijski transformišu radi dobijanja aktivnijih i djelotvornijih oblika. (Kovačević & Kundaković, 2007).

U našem regionu su aktuelni biljni antiseptici koji se koriste za profilaksu i terapiju infekcija gornjih disajnih puteva. Zahvaljujući svom digestivnom djelovanju, preparati koji sadrže ruzmarin su zastupljeni u apotekama u okviru biljnih mješavina, čajeva i kapi za bolje varenje. Takođe, zahvaljujući svom antimikrobnom djelovanju ruzmarin je sastojak biljnih mješavina kod infekcija urinarnog trakta. Antimikrobno djelovanje ruzmarina se ispoljava i u hrani jer dodatak

ružmarina kao začina smanjuje nastanak patogenih mikroorganizama. Koristi se godinama u tradicionalnoj medicini za inhalaciju jer suzbija razvoj patogena i infekcije gornjih disajnih puteva (Mathlouthi i sar., 2012).

Pauli i Schilcher (2010) su prikazali istraživanja o antimikrobnoj aktivnosti etarskih ulja prema monografijama iz Evropske Farmakopeje VI. Kako u svom istraživanju navode Pauli i Schilcher (2010), jedno od prvih ovakvih istraživanja bilo je sprovedeno u kasnom devetnaestom vijeku kada je Buchholtz ispitivao inhibitornu aktivnost timola i fenola na bakterijskim kulturama. Tada je utvrđeno da timol pokazuje 10 puta veću aktivnost od fenola. U Evropsku farmakopeju VI, koja je objavljena 2007. godine, uvršteno je 28 etarskih ulja. Među ovih 28 etarskih ulja, uvršteno je i etarsko ulje ružmarina dobijeno destilacijom cvjetnih nadzemnih dijelova pomoću vodene pare koje je pokazalo i antimikrobnu aktivnost. Broj ispitivanja na životinjama je ograničen, ali na osnovu tih ispitivanja, utvrđeno je da ružmarin, u preporučenim dozama, nema genotoksična, reproduktivna kao ni kancerogena svojstva (Evropska farmakopeja XI, 2023).

Uprkos velikom broju radova o antimikrobnom djelovanju ružmarina, kao i ostalih aromatičnih biljaka, detaljno poznavanje većine jedinjenja i njihovog mehanizma djelovanja još uvijek nedostaje. Ovo znanje je posebno važno za određivanje dejstva etarskih ulja na različite mikroorganizme, kako funkcionišu u kombinaciji sa drugim antimikrobnim jedinjenjima i njihova interakcija sa hranom (Bošković i sar., 2013). Primjena inkapsuliranih etarskih ulja je interesantna jer omogućava njihovo kontrolisano i produženo oslobađanje, što povećava njihovu bioraspoloživost i efikasnost protiv patogena otpornih na više lijekova (Genena i sar., 2008). Posljednjih godina, zbog sve negativnije percepcije potrošača o sintetičkim konzervansima, interesovanje za etarska ulja i njihovu primjenu u hrani je pojačana. Dalje, razvoj otpornosti mikroorganizama na različite antimikrobne lijekove predstavlja veliki izazov za medicinsku oblast. Za prevazilaženje ovih problema istražuje se nano-kapsuliranje etarskih ulja i iskorišćavanje sinergije između etarskih ulja, sastojaka etarskih ulja i antibiotika kao odgovor na ovaj problem, mada se i dalje malo zna o njihovim interakcijama koje dovode do aditivnih, sinergističkih ili antagonističkih efekata. Zato je potreban veći broj istraživanja o dejstvu, mehanizmu i ulozi etarskih ulja u liječenju različitih infekcija (Genena i sar., 2008).

Ispitivanja o dejstvu etarskog ulja ruzmarina sa tetraciklinom, gentamicinom, sulfazotrimom, hloramfenikolom i cefepimom pokazale su sinergijski efekat protiv bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (Murino i sar., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal i metode

3.1.1. Biljni materijal

Za eksperimentalni dio rada korišćeno je list ruzmarin prije faze cvjetanja, tokom faze cvjetanja i nakon faze cvjetanja, kao u cvijet ruzmarina. Sirovi uzorak ruzmarina sakupljen je na teritoriji opštine Nikšić ($42^{\circ}46'44.5''N$ $18^{\circ}57'15.2''E$). Na slici 4 je prikazan izgled ruzmarina koji je korišćen u ovom radu a na slici 4a lokalitet uzorkovanja biljke.



Slika 4. Ruzmarin (Autor: Krunić, 2024)

4a: Lokalitet uzorkovanja ruzmarina

Uzorak ruzmarina, prije cvjetanja, ubran je u februaru, kada je najpogodnije za ovu fazu vegetativnog ciklusa. Krajem marta 2023. godine ruzmarin je procvjetao, u skladu sa klimatskim uslovima, za razliku od prethodnih godina kada je cvjetao u aprilu. U istom periodu uzorkovan je cvijet i list ruzmarina u toku cvjetanja. Cvijet je počeo da opada u junu, nakon čega je ubran uzorak

ruzmarina za vegetativnu fazu biljke poslije cvjetanja. Poslije branja ruzmatina, pažljivo su odstranjeni drvenasti dijelovi, ostaci zemlje i druge primjese. Nakon uklanjanja primjesa, lišće i cvijet biljke je sušeno na sobnoj temperaturi, bez prisustva direktne sunčeve svjetlosti i u odsustvu vlage. Na taj način droga je sačuvala kvalitetnu boju, aromu, i zadržala svježinu. Na ovakav način je sačuvano etarsko ulje u kanalima i porama same biljke.

Procesom sušenja se od sirovog biljnog materijala dobijaju se biljne droge. Po propisu Farmakopeje (Ph.Eur. 6.0.), količina vlage u drogama se kreće oko 10%.

3.1.2. Određivanje srednjeg prečnika čestica

Sasušeni biljni materijal je samljeven u blenderu marke „Gorenje“, u trajanju od 60 s i prosijan. Za prosijavanje usitnjenog biljnog materijala korišćen je set sita Erweka. Masa uzorka droge prije usitnjavanja za uzorak prije cvjetanja je 80 g, za uzorak tokom cvjetanja masa neusitnjene droge je 94 g, za uzorak nakon cvjetanja masa droge je 105 g i za uzorak cvijeta ruzmarina masa droge je 90 g.

Po propisu iz Ph Jug (V), stepen usitnjenosti droge se može definisati preko veličine srednjeg prečnika (d). Usitnjena droga mljevenjem se prenosi na set sita (prvo sito u setu je ono kroz koje prolazi cjelokupna masa uzorka, a na kraju je takozvano „slijepo sito“). Stavi se poklopac, i prosijava 20 minuta. Zatim se mjeri masa dijela biljne droge na svakom situ i izračunava maseni procenat svake frakcije.

Srednji prečnik čestica (d) se izračunava iz sledećeg izraza:

$$\frac{100}{d} = \sum \left(\frac{m_i}{d_i} \right)$$

m_i je maseni procenat frakcije, d_i srednji prečnik i frakcija.

3.1.3. Izolacija etarskog ulja metodom destilacije vodenom parom (hidrodestilacija)

Za izolaciju etarskih ulja ruzmarina u ovom radu korišćena je metoda destilacije vodenom parom. Hidrodestilacija je izvršena korišćenjem aparature po Clevenger-u (Ph. Jug. IV) (Slika 5).

Usitnjena droga (100 g) se sipa u destilacioni balon uz dodatak destilovane vode od 700-800 mL. Nakon dodatka vode, destilacioni balon se spušta u grejno tijelo i smješa sa zagrijava do ključanja. Biljni materijal je destilovan 2 h kako propisuje Ph.Yug. IV.

Sadržaj etarskog ulja u biljnim drogama se računa po formuli:

$$X=b/a*100$$

gdje je: X-sadržaj ulja (%V/m),

a - masa droge (g),

b - zapremina ulja (mL).



Slika 5. Aparatura po Clevenger-u (Autor Krunić, 2024)

Najveći dio etraskog ulja ruzmarina se dobija u prvih dvadeset minuta do pola sata. U narednih 90 minuta prinos je veoma nizak.

Izolovano etarsko ulje ruzmarina čuvano je u tamnoj bočici sa poklopcem, zaštićeno od okolnih uticaja, na temperaturi od 4 °C (u frižideru).

3.1.4. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS)

Kvalitativna i semikvantitativna analiza etarskog ulja ruzmarina dobijenog od ruzmarina prije cvjetanja, tokom cvjetanja i nakon faze cvjetanja obavljena je na gasnom hromatografu sa nasenim spektrometrijskim detektorom odnosno GC-MS. Analize sastava etarskih ulja dobijenih hidrodestilacijom u laboratoriji za Organsku hemijsku tehnologiju Metalurško-tehnološkog fakulteta, rađene su u Centru za ekotoksikološka ispitivanja (CETI) u Podgorici.

GC-MS analiza je urađena na Shimadzu 2010+ gasno hromatografskom spektrometru (Slika 16) snadbjevenim sa ZB-5ms (30m x 0.5mm x 0.25 μ m) kapilarnom kolonom. Etarsko ulje i ekstrakti (30 mg/ml) u smješi rastvarača hlороform-metanol (3:1) su injektovani automatski (3 μ l) u splitless i split modu (1:10). Temperatura injektora iznosila je 260°C, a temperatura interfejsa 300 °C. Temperaturni program: 60 °C (2min), temperatura kolone je mijenjana linearno od 60-300 °C (4°C/min). Helijum se koristi kao gas nosilac pri brzini proticanja od 1,2 ml/min. i pritisku 61,8 kPa. Uslovi MS su: jonizovani napon 70 eV, kontrolni interval 1.5 s, detektovani napon 1.0 kV i m/z opsega 40-500. Za obradu podataka korišćena je upravljačka stanica opremljena Class 5000 softverom. Identifikacija komponenata vršena je na osnovu poređenja retencionih vremena pikova uzoraka sa retencionim vremenima raspoloživih čistih komponenata i konfirmativnom masenom spektrometrijom, pri čemu su korišćene datoteke: Pmw-Tox2, Nist1.L sa 21000 i Wiley.L sa 229.000 referentnih masenih spektara aktivnih u EI modu (70 eV). Na slici 6 prikazan je gasno-maseni spektrofotometar.



Slika 6. Gasno-maseni spektrofotometar (Zlatanović, 2019)

3.1.5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Princip difuzione metode je da antibakterijski lijek difunduje u hranljivu podlogu i djeluje inhibitorno, u većoj ili manjoj mjeri, na razmnožavanje bakterija prethodno zasijanih na toj podlozi.

Metoda koja se najčešće primjenjuje metoda tablete, odnosno disks metoda. Princip metode je takav da omogućava testiranje osjetljivosti pomoću očitavanja inhibicijskih zona oko diskova koji su popunjeni antibioticima. Prečnik zone inhibicije je proporcionalan koncentraciji datog antibakterijskog sredstva jer su ostali uslovi u metodi standardizovani (vrijeme inkubacije, temperatura, pritisak, pH) (Bodea i sar., 2022).

Naime, ako je zasijana bakterija osjetljiva na dejstvo lijeka, ona neće porasti u zoni njegove aktivnosti. Širina te zone inhibicije predstavlja stepen osjetljivosti bakterije koji se označava sa S (senzitivan – osjetljiv soj) odnosno sa I (intermedijaran – srednje osjetljiv soj). Ako je bakterija otporna na dejstvo lijeka zona inhibicije je uska ili uopšte ne postoji R (rezistentan – otporan soj). (Beigomi, 2021)

Širinu zone inhibicije može da zavisi od sljedećih faktora:

- Osobine podloge;
- Veličina inokuluma;
- Faza razmnožavanja ispitivane bakterije;
- Stabilnost antibakterijskog sredstva.

Da bi se otklonio uticaj ovih faktora za izvođenje antibiograma se koristi standardna Mueller – Hintonova podloga (Alloh i sar., 2024).

Modifikovana difuziona tehnika na Mueller-Hinton agaru primjenjena je u ovom master radu za ispitivanje osjetljivosti bakterija *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*. Bakterije su kultivisane na Nutrient bujonu (Torlak, Beograd) na $37\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Difuziona tehnika je sprovedena razlivanjem Mueller-Hinton agara (Difco) u Petrijeve ploče prečnika 90 mm sa slojem debljine 4 mm. Posle očvršćavanja srednjeg sloja, površina ploča je inokulisana korišćenjem sterilnog tampona koji sadrži odgovarajuću mikrobnu suspenziju i ostavljena da se osuši. Nerazređeno ukusno eterično ulje (1, 3 i 5 μ L) stavljeno je u bunarčiće (prečnika 6 mm) na podlozi pripremljenoj po potrebi, Petrijeve ploče su držane na sobnoj temperaturi 30 min, a zatim inkubirane na 37 °C 20 h. Očitavanje rezultata je vršeno mjerenjem prečnika zona inhibicije, jasnog rasta u mm. Svi testovi inhibitorne aktivnosti su izvedeni u duplikatu i zone inhibicije u razvoju su upoređene sa onima na referentnim diskovima.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Određivanje srednjeg prečnika čestica ruzmarina i prinos etraskog ulja

U tabeli 1 je dat prikaz mase prosijane droge kroz različite promjere sita, za uzorak prije cvjetanja.

Tabela 1. Masa prosijane droge kroz set sita za uzorak prije cvjetanja

Broj sita	Promjer sita (mm)	Količina (g)
2	2.0	0.01
1	1.0	54
0.2	0.2	21
0.1	0.1	2.1
Frakcija zaostala na papiru	<0.10	0

Srednji prečnik čestica za uzorak prije cvjetanja:

$$100/d = \sum m_i/d_i = 100\%/d = 0.01\%/2\text{mm} + 54\%/1\text{mm} + 21\%/0.2\text{mm} + 2.1\%/0.1\text{mm}$$

$$100/d = 180.005 \Rightarrow \mathbf{d=0.555}$$

U tabeli 2 je dat prikaz mase prosijane droge kroz različite promjere sita, za izračunavanje srednjeg prečnika čestica uzorka ruzmarina tokom cvjetanja.

Tabela 2. Masa prosijane droge kroz sita za uzorak tokom cvjetanja

Broj sita	Promjer sita (mm)	Količina (g)
2	2.0	8.5
1	1.0	41.79
0.2	0.2	25.05
0.1	0.1	1.05
Frakcija zaostala na papiru	<0.10	0

Srednji prečnik čestica za uzorak tokom cvjetanja:

$$100/d = \sum m_i/d_i = 100\%/d = 8.5\%/2\text{mm} + 41.79\%/1\text{mm} + 25.05\%/0.2\text{mm} + 1.05\%/0.1\text{mm}$$

$$100/d = 181.79 \Rightarrow \mathbf{d=0.550}$$

Rezultati određivanja srednjeg prečnika čestica za uzorak cvijeta ruzmarina prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Masa prosijane droge kroz sita za uzorak cvijeta ruzmarina

Broj sita	Promjer sita (mm)	Količina (g)
2	2.0	1.06
1	1.0	35.5
0.2	0.2	26.6
0.1	0.1	1.5
Frakcija zaostala na papiru	<0.10	0

Srednji prečnik čestica za uzorak cvijeta ruzmarina:

$$100/d = \sum m_i/d_i = 100\%/d = 1.06\%/2\text{mm} + 35.5\%/1\text{mm} + 26.6\%/0.2\text{mm} + 1.5\%/0.1\text{mm}$$

$$100/d = 184.03 \Rightarrow d = 0.543$$

U tabeli 4 je dat prikaz mase prosijane droge kroz različite promjere sita, za izračunavanje srednjeg prečnika čestica uzorka ruzmarina nakon cvjetanja.

Tabela 4. Masa prosijane droge kroz sita za uzorak nakon cvjetanja ruzmarina

Broj sita	Promjer sita (mm)	Količina (g)
2	2.0	1.82
1	1.0	41.33
0.2	0.2	22.9
0.1	0.1	2
Frakcija zaostala na papiru	<0.10	0

Srednji prečnik čestica ruzmarina nakon cvjetanja:

$$100/d = \sum m_i/d_i = 100\%/d = 1.82\%/2\text{mm} + 41.33\%/1\text{mm} + 22.9\%/0.2\text{mm} + 2\%/0.1\text{mm}$$

$$100/d = 176.74 \Rightarrow d = 0.565$$

Prinos etarskog ulja lista ruzmarina je 1,2% za uzorak prije cvjetanja, u toku cvjetanja dobijen je prinos od 1,4%. Dobijeno etarskog ulja je izrazito aromatičnog mirisa i blijedo žućkaste boje. Nakon cvjetanja, hidrodestilacijom lista ruzmarina dobijeno je 1% etarskog ulja, žućkaste boje i blažeg mirisa.

Hidrodestilacijom cvijeta ruzmarina dobijeno je 0,9% etarskog ulja, blijedo žućkaste boje i aromatičnog mirisa.

Baydar i saradnici (2007) su utvrdili da je najveći prinos etarskog ulja zabilježen tokom avgusta, odnosno tokom faze cvjetanja ruzmarina (1.35%), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

U istraživanju koje su sprovedi Barut i saradnici (2022) za ruzmarin iz mediteranske regije, najveći sadržaj eteričnog ulja (1.68%) utvrđen je u fazi prije cvjetanja, što je bilo 16% odnosno 20% više u odnosu na period u toku nakon cvjetanja, redom. Prema rezultatima Mwithiga i saradnika (2022) prinos etarskog ulja ruzmarina sa teritorije Kenije se kretao 0,54 – 2,82 %, za sve faze vegetativnog ciklusa. Poređenjem rezultata može se zaključiti da je dobijeni prinos etarskog ulja ruzmarina sa u ovom master radu zadovoljavajući i da je korišćena sirovina dobrog kvaliteta. Dalje, Salido i saradnici (2022) su zabilježili da su najveći prinosi etarskog ulja ruzmarina iz Španije dobijeni u periodu cvjetanja (1,6-1,8%), što se poklapa sa rezultatima dobijenim u ovom master radu. Farhani i saradnici (2024) sprovedi su istraživanje o uticaju ekoloških činilaca na dinamiku etarskog ulja ruzmarina, uglavnom na njegov sastav i prinos etarskog ulja. Uzorci su prikupljeni u sjeveroistočnom Maroku i prinos etarskog ulja se kretao od 2,3 do 3%. Umjerena negativna korelacija primjećena je između padavina i prinosa etarskog ulja, dok je temperatura imala umjereno pozitivan uticaj. Istraživanja pokazuju da, osim vegetativne faze, na prinos etarskog ulja djeluju i ekološki činioci kao što su insolacija, nadmorska visina, temperatura, nagib terena (Farhani i sar., 2024).

Hezil i saradnici (2022) su sprovedi istraživanje hemijskog sastava i antibakterijsko dejstvo etarskog ulja *Rosmarinus officinalis* sa teritorije Alžira i prinos ulja je bio 1,6%.

Chama i saradnici (2022) su sprovedi istraživanje dva roda: *Rosmarinus eriocalik* i *Rosmarinus officinalis* sa teritorije Alžira, pod uticajem sredozemne klime. Rezultati prinosa etarskih ulja *Rosmarinus eriocalik* i *Rosmarinus officinalis* L. su bili 1% i 0,63%, respektivno.

Bajalan i saradnici (2018) sprovedli su istraživanje o varijacijama u prinosu etarskog ulja i procentualne količine biološki aktivnih jedinjenja u listu ruzmarina sa teritorije Irana. Rezultati su pokazali da prinosi etarskog ulja pokazuju značajne varijacije među ispitivanim uzorcima. Najveći sadržaj etarskog ulja ruzmarina je zabilježen kod uzoraka prije cvjetanja i poslije cvjetanja (2.6 ml/100 g i 1.3 ml/100 g, respektivno).

4.2. Hemijski sastav etarskog ulja ruzmarina prije cvjetanja

Hemijski sastav (%) etarskog ulja ruzmarina prije cvjetanja prikazan je u tabeli 5.

Tabela 5. Hemijski sastav (%) etarskog ulja ruzmarina prije cvjetanja

Komponenta	Sadržaj (mas%)	Oznaka metode
α -pinen	17.27	GCMS-SCAN
kamfen	7.16	GCMS-SCAN
verbenen	0.93	GCMS-SCAN
β -pinen	2.34	GCMS-SCAN
3-oktanon	2.76	GCMS-SCAN
β -mircen	4.03	GCMS-SCAN
3-oktanol	0.21	GCMS-SCAN
α -felandren	0.44	GCMS-SCAN
(-)-3-karen	0.65	GCMS-SCAN
α -terpinen	0.74	GCMS-SCAN
p-cimen	2.38	GCMS-SCAN
1,8-cineol	16.87	GCMS-SCAN
γ -terpinen	0.83	GCMS-SCAN
α -terpinolen	1.18	GCMS-SCAN
(+)-linalol	4.16	GCMS-SCAN
hrizantenon	0.81	GCMS-SCAN
kamfor (+)	11.79	GCMS-SCAN
trans- pino kamfon	1.04	GCMS-SCAN
(-) trans- pinokarbon	0.32	GCMS-SCAN

(-)-borneol	7.22	GCMS-SCAN
Cis-pino kamfon	1.87	GCMS-SCAN
terpinen-4-ol	1.82	GCMS-SCAN
verbenon	5.07	GCMS-SCAN
α -terpinol	2.41	GCMS-SCAN
(E-geraniol)	0.36	GCMS-SCAN
bornil-acetil-etar	2.26	GCMS-SCAN
β -kariofilen	1.92	GCMS-SCAN
α -kariofilen	0.28	GCMS-SCAN
(-)- β -kariofilen epoksid	0.31	GCMS-SCAN

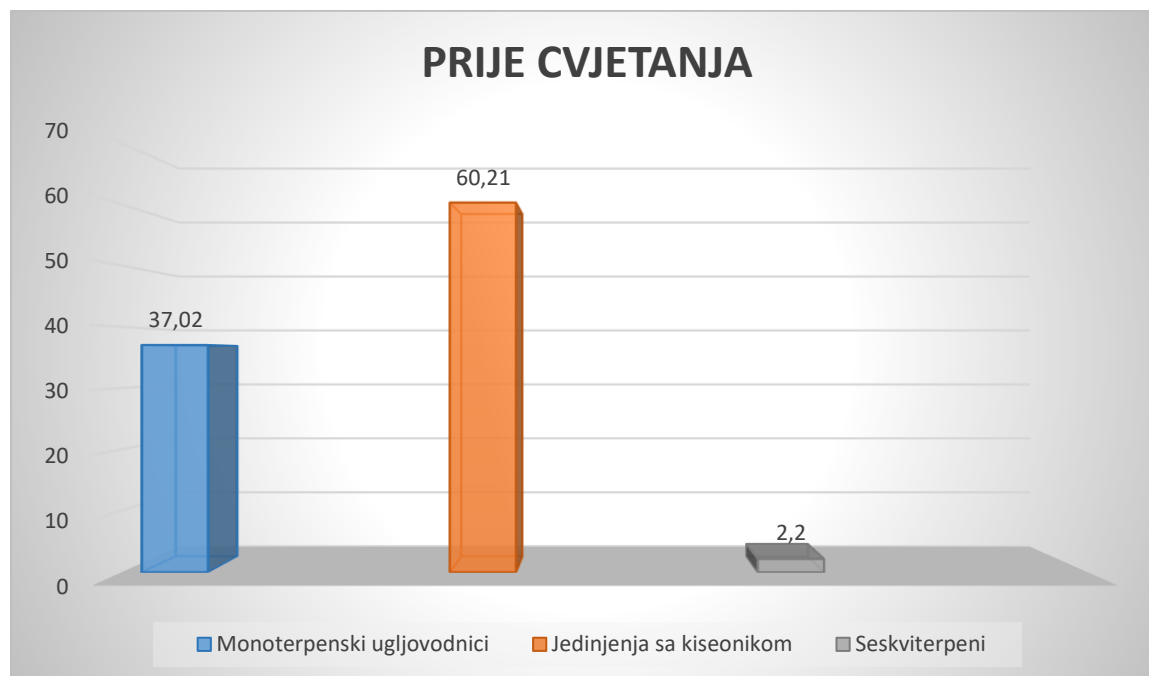
Ukupno je identifikovano 29 komponenti etarskog ulja ruzmarina prije cvjetanja, što čini 99,35% ukupne količine ulja. Glavne komponente etarskog ulja lista ruzmarina uzorkovanog prije cvjetanja su α -pinen (17,27%), 1,8-cineol (16,87%), kamfor (11,79%), (-)-borneol (7,22%), kamfen (7,16%) i verbenon (5,07%).

U istraživanju koje su sprovedi Barut i saradnici (2022) u etarskom ulju ruzmarina identifikovano je 28 jedinjenja koja predstavljaju 95.74%-96.74% ukupnog eteričnog ulja. Glavna jedinjenja u etarskom ulju ruzmarina prije cvjetanja su kamfor (28.43%-32.74%), 1,8-cineol (20.80%-22.61%), izoborneol (6.05%-7.28%), verbenol (5.17%-6.98%) i limonen (5.71%-6.23%). Zaključeno je da je vegetativna faza prije cvjetanja za uzorke ruzmarina iz mediteranske regije optimalna za prinos etarskog ulja kao i da je u ovom ulju najveći sadržaj važnih oksigenovanih monoterpena kamfora i 1,8 cineola.

U istraživanju koje su sprovedi Rašković i saradnici (2014) identifikovano je 29 hemijskih jedinjenja proučavanog etarskog ulja ruzmarina sa teritorije Srbije prije cvjetanja, a glavni sastojci su bili 1,8-cineol (43,77%), kamfor (12,53%) i α -pinen (11,51%). Utvrđeno je da ispitivano etarsko ulje ispoljava hepatoprotektivna dejstva u dozama od 5 mg/kg i 10 mg/kg smanjenjem aktivnosti AST i ALT do 2 puta u serumu pacova sa akutnim oštećenjem jetre izazvanim ugljen-tetrahloridom.

Identifikovana jedinjenja u etarskom ulju ruzmarina mogu se svrstati u tri grupe: monoterpeni, seskviterpeni i jedinjenja sa kiseonikom. Udio navedenih grupa jedinjenja u ispitivanom etarskom ulju ruzmarina prije cvjetanja prikazan je na Dijagramu 1.

Hezil i saradnici (2022) su sproveli istraživanje hemijskog sastava etarskog ulja *Rosmarinus officinalis* sa područja Alžira prije cvjetanja i najzastupljenija komponenta je bila eukaliptol (18,58%).



Dijagram 1. Sastav etarskog ulja (%) ruzmarina prije cvjetanja po grupama jedinjenja

Ukupan udio monoterpenih ugljovodnika u etarskom ulju ruzmarina prije cvjetanja je 37.02%, dok je udio jedinjenja sa kiseonikom 60,21%. Sadržaj seskviterpena je nizak (2,2%). U istraživanju koje su sproveli Barut i saradnici (2022) procenat jedinjenja sa kiseonikom je 61,58%, monoterpenih ugljovodnika 36,05%, dok su seskviterpeni u tragovima (1.2%), i može se zaključiti da je sadržaj jedinjenja po grupama sličan dobijenim rezultatima u ovom master radu.

Na osnovu tabele 2 i dijagrama 1 se može vidjeti da u etarskom ulju ruzmarinu prije cvjetanja dominiraju jedinjenja sa kiseonikom (najviše zahvaljujući prisustvu 1,8 cineola i borneola), zatim monoterpeni ugljovodnici i to uglavnom ciklični (α -pinen, kamfen, β -pinen).

U ispitivanom etarskom ulju ruzmarina uzorka prije cvjetanja okigenovani monoterpen 1,8 cineol (eukaliptol) je prisutan u najvećoj količini. Eukaliptol je komponenta koja etarskim uljima koja ga sadrže daje prijatan efekat hlađenja (bosiljak, eukaliptus, nana) (Lana i sar., 2006).

Bajalan i saradnici (2018) su ispitivanjem lista ruzmarina sa područja Irana utvrdili da su glavni sastojci etarskog ulja uzorku prije cvjetanja su 1,8-cineol (5,32%), kamfor (1,58%) i α -pinen (14,19%).

1,8-cineol je poznat po svom mukolitičkom i spazmolitičkom djelovanju na respiratorni trakt, sa dokazanom kliničkom efikasnošću. 1,8-cineol je također pokazao terapijsko dejstvo, kao antiinflamatorni i antioksidativni agens, kod inflamatornih bolesti disajnih puteva kao što su astma i hronična opstruktivna plućna bolest. Ovo se odnosi na njegov način djelovanja, što je dokazano u brojnim pretkliničkim studijama. *In vitro* studije su pronašle jake dokaze da 1,8-cineol kontroliše inflamatorne procese i produkciju medijatora hipersekrecije sluzi izazvane infekcijom ili inflamacijom, tako što djeluje kao antiinflamatorni modifikator, a ne kao jednostavan mukolitički agens (Hoch i sar., 2023).

4.3. Hemijski sastav etarskog ulja ruzmarina u toku cvjetanja

U tabeli 6 je prikazan hemijski sastav etarskog ulja ruzmarina u toku cvjetanja, ispitan GC-MS metodom.

Tabela 6. Hemijski sastav (%) etarskog ulja ruzmarina u toku cvjetanja

Komponenta	Sadržaj (mas%)	Oznaka metode
(-)- α -pinen	16.44	GCMS-SCAN
Kamfen	6.43	GCMS-SCAN
verbenen	0.97	GCMS-SCAN
β -pinen	1.69	GCMS-SCAN
3-oktanon	2.77	GCMS-SCAN
β -mircen	3.44	GCMS-SCAN
3-oktanol	0.18	GCMS-SCAN

α -felandren	0.23	GCMS-SCAN
α -terpinen	0.42	GCMS-SCAN
p-cimen	2.60	GCMS-SCAN
1,8 cineol	14.02	GCMS-SCAN
γ -terpinen	0.37	GCMS-SCAN
α -terpinolen	0.79	GCMS-SCAN
(+)-linalol	3.72	GCMS-SCAN
Hrizantenon	0.70	GCMS-SCAN
kamfor (+)	11.28	GCMS-SCAN
pino kamfon-trans	1.34	GCMS-SCAN
(-)-trans-pinokarbon	0.33	GCMS-SCAN
(-)-borneol	9.01	GCMS-SCAN
cis-pinokamfon	2.41	GCMS-SCAN
terpinen-4-ol	2.08	GCMS-SCAN
α -terpinol	2.89	GCMS-SCAN
verbenon	6.84	GCMS-SCAN
(E)-geraniol	1.18	GCMS-SCAN
bornil-acetil-etar	2.21	GCMS-SCAN
β -kariofilen	1.28	GCMS-SCAN
α -kariofilen	0.21	GCMS-SCAN
(-)- β -kariofilen epoksid	0.68	GCMS-SCAN

Ukupno je identifikovano 28 komponenti, što čini 96.51% ukupne količine etarskog ulja ruzmarina u toku cvjetanja. Najzastupljenije komponente u etarskom ulju ruzmarina u toku cvjetanja su: α -pinen (16,44%), 1,8-cineol (14,02%), kamfor (11,28%), borneol (9,01%), kamfen (6,43%) i β -mircen (3,44%).

Hussain i saradnici (2013) su sproveli istraživanje o udjelu aktivnih komponenti u etarskom ulju ruzmarina, dobijenog od uzorka sa teritorije Pakistana. GC i GC-MS analiza etarskog ulja ruzmarina je pokazala da su glavne komponente 1,8-cineol (38,5%), kamfor (17,1%), α -pinen (12,3%), limonen (6,23%), kamfen (6,00%) i linalol (5,70%). Može se zaključiti da je sadržaj 1,8

cineola i kamfora u uzorku lista ruzmarina tokom cvjetanja sa teritorije Pakistana bio veći u poređenju sa rezultatima u ovom master radu.

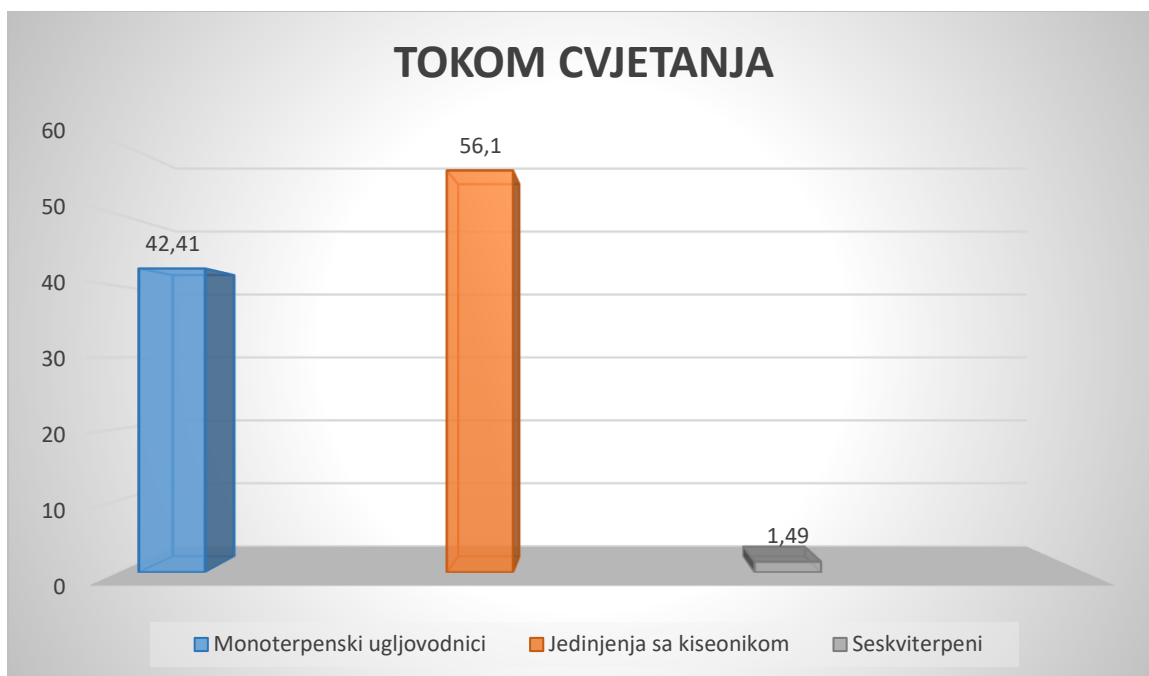
Sličan zaključak se može donijeti i pri poređenju rezultata iz ovog master rada sa istraživanjem etarskog ulja ruzmarina u fazi cvjetanja koje su sprovedi Hcini i saradnici (2013) na području Tunisa, gdje je u etarskom ulju najveći procenat 1,8 cineola (33,08%) a zatim kamfora (18,13%) i α -pinena (9,23%). Najveći procenat etarskog ulja ruzmarina u pomenutom radu čine oksigenovani monoterpeni (44,6%) a zatim monoterpenski ugljovodonici (30,8%).

Salido i saradnici (2003) ispitivali su hemijski sastav etarskog ulja španskog ruzmarina u toku cvjetanja. Svi proučavani uzorci ispitivanog španskog ruzmarina pripadaju hemotipu α -pinen/1,8-cineol/kamfor, a glavne komponente su kamfor (17,2-34,7%), α -pinen (10,2-21,6%), 1,8-cineol (12,1-14,4%), kamfen (5,2-8,6%), borneol (3,2-7,7%), β -pinen (2,3-7,5%) i verbenon (2,2-5,8%).

Slično istraživanje su sprovedi Bajalan i saradnici (2003) godine kad su ispitivali uzorke ruzmarina sa različitih teritorija Iraka. Zaključili su da do razlike u hemijskom sastavu etarskog ulja ruzmarina dolazi zbog razlike u tlu, klimi i području sa kojeg je ispitivani uzorak. Glavni sastojci su bili 1,8-cineol (5,32–28,29%), kamfor (1,58–25,32%) i α -pinen (14,19–21,43%).

U dijagramu 2 je prikazan odnos grupa jedinjenja u ispitivanom etarskom ulju ruzmarina tokom cvjetanja.

Na osnovu dijagrama 2 može se zaključiti da je zadržan je isti trend kao u etarskom ulju ruzmarina prije cvjetanja, odnosno da su u etarskom ulju ruzmarina tokom cvjetanja najzastupljenija grupa jedinjenja sa kiseonikom, a da su najmanje zastupljeni seksviterpeni.



Dijagram 2. Sastav etarskog ulja ruzmarina u toku cvjetanja po grupama jedinjenja.

Sa dijagrama 2 i iz tabele 3 može se vidjeti da u etarskom ulju ruzmarina prije cvjetanja najviše ima jedinjenja sa kiseonikom (56,1%), zatim monoterpenih ugljovodonika (42,41%) dok seskviterpenih ugljovodonika ima 1,49%. Salido i saradnici (2003) su ispitivanjem ruzmarina iz Španije prije cvjetanja utvrdili da oksigenovanih monoterpena u etarskom ulju ima 44,6% dok monoterpenih ugljovodonika ima 30,8%, što pokazuje da ispitivano etarsko ulje u ovom radu imalo mnogo veći sadržaj i oksigenovanih jedinjenja i monoterpenih ugljovodonika.

Ako poredimo rezultate iz ovog master rada sa rezultatima istraživanja etarskog ulja lista ruzmarina koje su sproveli Barut i saradnici (2022) utoku cvjetanja gdje je sadržaj jedinjenja sa kiseonikom je 60,5%, monoterpenih ugljovodonika 40,45% dok su seskviterpeni zastupljeni 1,56%, može se zaključiti da su dobijeni približno isti rezultati.

Kamfor je hemijsko jedinjenje koja se dobija destilacijom kore i drveta kamforovca. Danas se kamfor obično pravi od terpentinskog ulja. Zahvaljujući karakterističnom mirisu, kamfor se može koristiti i kao sredstvo u liječenju različitih bolova a ima i efekat hlađenja. Oralno uzimanje kamfora nije bezbjedno. Proizvodi od kamfora uključuju kamforovano ulje ili kamforovana

alkoholna pića. Kamfovano ulje je uklonjeno sa američkog tržišta 1980-ih godina zbog slučajnih trovanja (Hcini i sar., 2013).

4.4. Hemijski sastav etarskog ulja cvijeta ruzmarina

U tabeli 7 je prikazan hemijski sastav etarskog ulja ruzmarina u toku cvjetanja, ispitan GC-MS metodom.

Tabela 7. Hemijski sastav (%) etarskog ulja cvijeta ruzmarina

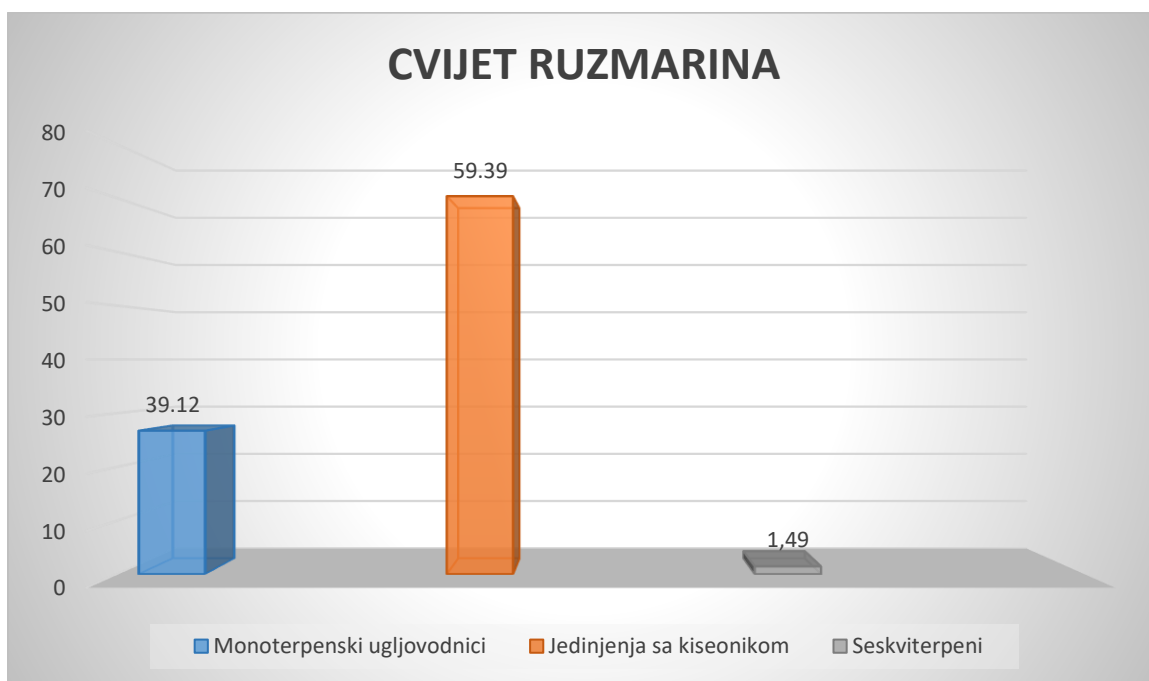
Komponenta	Sadržaj (mas%)	Oznaka metode
(-)- α -pinen	11.03	GCMS-SCAN
kamfen	6.54	GCMS-SCAN
verbenen	0.28	GCMS-SCAN
β -pinen	5.06	GCMS-SCAN
3-oktanon	0.42	GCMS-SCAN
β -mircen	1.28	GCMS-SCAN
α -terpinen	0.27	GCMS-SCAN
p-cimen	0.56	GCMS-SCAN
1.8 cineol	15.16	GCMS-SCAN
γ -terpinen	0.55	GCMS-SCAN
α -terpinolen	0.34	GCMS-SCAN
(+/-)-linalol	1.1	GCMS-SCAN
hrizantenon	1	GCMS-SCAN
kamfor (+)	17.19	GCMS-SCAN
trans- pinokamfon	0.69	GCMS-SCAN
(-)-trans-pinokarbon	0.26	GCMS-SCAN
(-)-borneol	13.59	GCMS-SCAN
cis- pinokamfon	3.98	GCMS-SCAN
terpinen-4-ol	1.91	GCMS-SCAN
α -terpineol	0.73	GCMS-SCAN

verbenon	4.69	GCMS-SCAN
bornil acetil etar	8.38	GCMS-SCAN
β -kariofilen	1.61	GCMS-SCAN
α -kariofilen	0.22	GCMS-SCAN
(-)- β -kariofilen epoksid	1.62	GCMS-SCAN

Ukupni procenat identifikovanih komponenata iz etarskog ulja cvijeta ružmarina iznosio je 96,7%, odnosno izolovano je ukupno 25 jedinjenja. Najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju cvijeta ružmarina su: kamfor (17.19%), 1,8 cineol (15,16%), borneol (13,59%), α -pinen (11,03%), bornil acetil etar (8,38%), kamfen (6,54%) i verbenon (4,69%).

Na dijagramu 3 prikazan je hemijski sastav etarskog ulja cvijeta ružmarina nakon cvjetanja.

□



Dijagram 3. Sastav etarskog ulja cvijeta ružmarina po grupama jedinjenja

Na osnovu dijagrama 3 može vidjeti da u etarskom ulju cvijeta ružmarina dominiraju jedinjenja sa kiseonikom – 59,39% (borneol, eukaliptol i ostali), a zatim monoterpeni

ugljovodonici (39,12%). Ako poredimo sadržaj jedinjenja po grupama u etarskom ulju cvijeta ruzmarina sa uzorcima ulja ruzmarina u toku cvjetanja i prije cvjetanja, vidi se da je razlika u sadržaju ovih jedinjenja značajna. U uzorku etarskog ulja cvijeta ruzmarina dominiraju jedinjenja sa kiseonikom, i njihov sadržaj je skoro tri puta veći od monoterpenskih ugljovodonika. Može se zaključiti da je etarsko ulje cvijeta ruzmarina, uzorkovanog sa područja Nikšića, dobrog kvaliteta i da ima potencijal korišćenja u farmaceutskoj industriji.

Istraživanja etarskog ulja cvijeta ruzmarina su veoma rijetka, u pretraženoj i dostupnoj literaturi. Jedno takvo istraživanje sprovedeno je od strane Molinera i saradnika (2020) kako bi utvrdili njegov značaj kao hranljivog nutrijenta u ishrani. Kroz *in vitro* i *in vivo* testove korišćenjem *Caenorhabditis elegans* utvrdili su da u cvijetu ruzmarina postoji potencijal za upotrebu u farmakološke svrhe.

4.5. Hemijski sastav etarskog ulja lista ruzmarina nakon cvjetanja

U tabeli 8 je prikazan sastav etarskog ulja lista ruzmarina nakon cvjetanja.

Tabela 8. Hemijski sastav (%) etarskog ulja ruzmarina nakon cvjetanja

Komponenta	Sadržaj (mas%)	Oznaka metode
(-)- α -pinen	20.59	GCMS-SCAN
kamfen	7.86	GCMS-SCAN
verbenen	1	GCMS-SCAN
β -pinen	3.96	GCMS-SCAN
3-oktanon	2.69	GCMS-SCAN
β -mircen	4.21	GCMS-SCAN
3-oktanol	0.12	GCMS-SCAN
α -felandren	0.41	GCMS-SCAN
α -terpinen	0.82	GCMS-SCAN
p-cimen	1.96	GCMS-SCAN

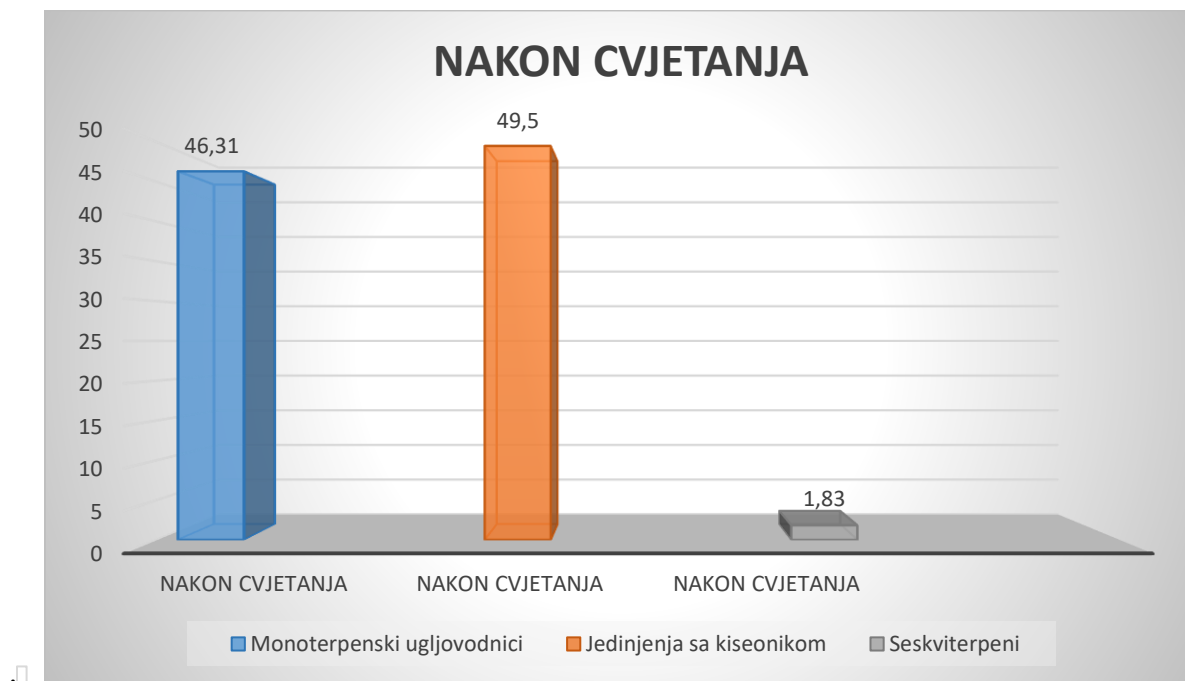
1,8-cineol	14.7	GCMS-SCAN
γ -terpinen	1.18	GCMS-SCAN
α -terpinolen	1.46	GCMS-SCAN
(+)-linalol	2.86	GCMS-SCAN
hrizantenon	0.6	GCMS-SCAN
kamfor (+)	8.97	GCMS-SCAN
trans- pino kamfon	0.83	GCMS-SCAN
(-)-pino karbon	0.2	GCMS-SCAN
(-)-borneol	5.65	GCMS-SCAN
cis-pinokamfon	2.17	GCMS-SCAN
terpinen-4-ol	1.53	GCMS-SCAN
α -terpineol	1.55	GCMS-SCAN
verbenon	4.66	GCMS-SCAN
(E)-geraniol	0.49	GCMS-SCAN
bornil acetil etar	4.73	GCMS-SCAN
β -kariofilen	1.96	GCMS-SCAN
α -kariofilen	0.28	GCMS-SCAN
(-)- β -kariofilen epoksid	0.61	GCMS-SCAN

Ukupno je identifikovano 98.09% komponenti u etarskom ulju ruzmarina nakon cvjetanja, odnosno 28 izolovanih jedinjenja. Glavne komponente su u etarskom ulju ruzmarina nakon cvjetanja: α -pinen (20,59%), 1,8-cineol (14,7%), kamfor (8,97%), kamfen (7,86%), borneol (5,65%) i bornil acetil etar (4,73%).

U uzorku etarskog ulja ruzmarina nakon cvjetanja α -pinen je zastupljen sa 20,59%. Pinen je organsko jedinjenje iz klase terpena, jedan od dva izomera pinena. Nalazi se u uljima mnogih vrsta četinara, posebno bora. Komponenta α -pinen je supstanca koja je odobrena kao bezbjedna sirovina u proizvodnji kozmetičkih proizvoda (Jafari-Sales, 2020). U prilog ovom podatku govori činjenica da je α -pinen u Aneksu III Uredbe o kozmetici EC nakon procjene Naučnog komiteta za bezbjednost potrošača Komisije naveden kao bezbjedan sastojak u kozmetičkim proizvodima.

Ograničenja za upotrebu se mogu odnositi na kriterijum čistoće i maksimalnu koncentraciju (Gerber i sar., 2009).

Na dijagramu 4 je prikazan odnos komponenti u etarskom ulju ružmarina nakon vegetativne faze cvjetanja.



Dijagram 4. Sastav (%) etarskog ulja ružmarina nakon cvjetanja po grupama jedinjenja

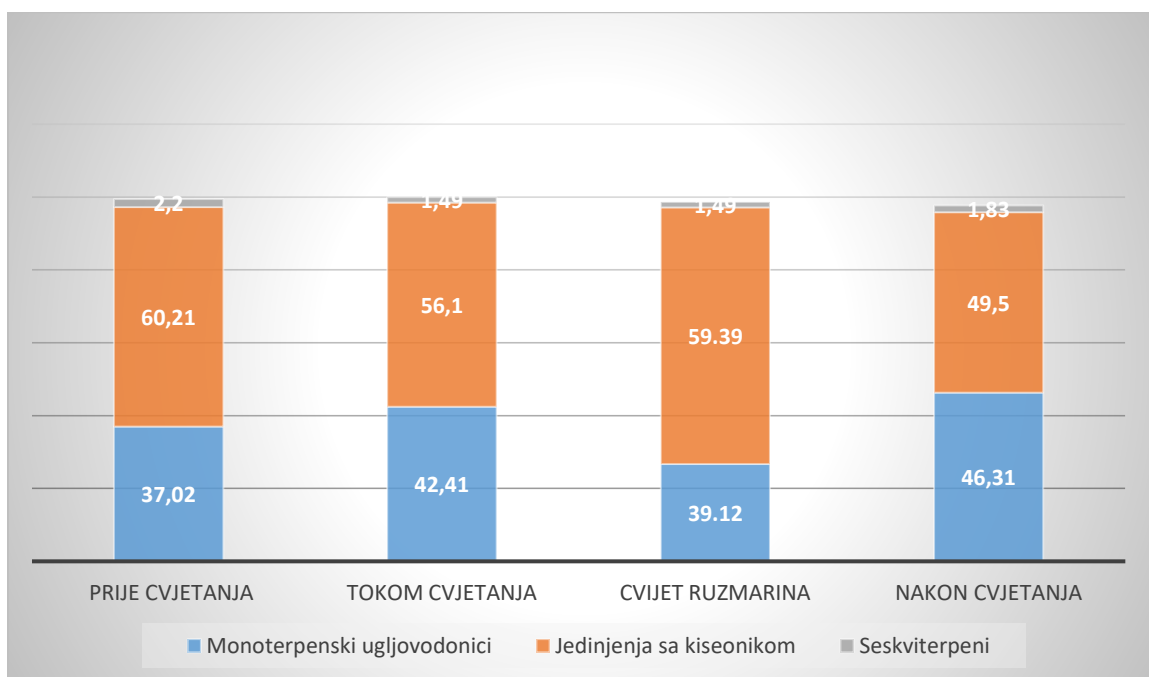
Na osnovu dijagrama 4 može se vidjeti da u etarskom ulju ružmarinu nakon cvjetanja najviše ima jedinjenja sa kiseonikom (49,5%), zatim monoterpenih ugljovodnika (46,31%), dok je sadržaj seskviterpena 1,83%. Primjećuje se da je razlika u sadržaju monoterpenih ugljovodnika i jedinjenja sa kiseonikom najmanje uočljiva kod etarskog ulja ružmarina nakon cvjetanja.

Alipour i saradnici (2016) sproveli su istraživanje o uticaju vegetativnog ciklusa na prinos etarskog ulja, kao i procenat glavnih komponenti, ispitivani uzorak ružmarina je sa teritorije Irana. Došli su do zaključka da je prinos etarskog ulja nakon cvjetanja 1,15%, dok su najzastupljenije komponente u uzorku etarskog ulja nakon cvjetanja: α -pinen (7,5%), kamfen (6,5%) i 1,8-cineol (9,4%).

Hezil i saradnici (2022) su ispitivali hemijski sastav i antibakterijsko dejstvo etarskog ulja ruzmarina dobijenog od uzorka nakon cvjetanja. Glavna jedinjenja u ovom uzorku su bila: eukaliptol (18,58%), α -pinen (9,14%) i kamfen (5,68%). Sadržaj jedinjenja sa kiseonikom je bio 50,31%, dok je sadržaj monoterpenskih ugljovodnika 48,51%.

4.6. Uporedna analiza sadržaja jedinjenja etarskog ulja ruzmarina

Uporednom analizom dobijenih rezultata sadržaja po grupama jedinjenja etarskog ulja lista ruzmarina po vegetativnim fazama, kao i cvijeta ruzmarina uočava se da dominantnu grupu terpena čine jedinjenja sa kiseonikom (dijagram 5).



Dijagram 5. Odnos sadržaja (%) grupa jedinjenja u uzorcima etarskog ulja ruzmarina

Na osnovu dijagrama 5 može se uočiti da jedinjenja sa kiseonikom dominiraju u svim uzorcima ruzmarina, nezavisno od vegetativnog ciklusa ove biljke. Najveći sadržaj jedinjenja sa kiseonikom je zabilježen u uzorku prije cvjetanja ruzmarina (60,21%), zatim u uzorku cvijeta ruzmarina (59,39%), a nešto manji procenat zabilježen je u uzorku tokom cvjetanja (56,1%) i najmanji za uzorak nakon cvjetanja (49,5%). Najveći sadržaj monoterpenskih ugljovodnika

zabilježen u uzorku ruzmarina u toku cvjetanja (42,41%), zatim nakon cvjetanja (46,31%) dok je niži sadržaj ovih jedinjenja u listu prije cvjetanja (37,02%) i cvijetu ruzmarina (39,12%).

U istraživanju koje su sproveli Barut i saradnici (2022) najveći sadržaj etarskog ulja ruzmarina dobijen je u periodu prije cvjetanja, i to sa mediteranskog područja. Iako sadržaj komponenata varira u zavisnosti od vremena berbe tj. od vegetacione faze biljke, glavna jedinjenja identifikovana u etarskom ulju ruzmarina su kamfor, 1,8-cineol, izoborneol, verbenol i limonen. Zbog najvećeg sadržaja etarskog ulja, kao i visokog sadržaja kamfora, 1,8-cineola i limonena, Barut i saradnici su došli do zaključka i da je vrijeme prije cvjetanja najprikladnije vrijeme berbe ruzmarina. Nadalje, preporučuje se izvođenje dodatnih agronomskih studija, sa posebnim akcentom na studije za dobijanje kvalitetnijih proizvoda koji su traženi na tržištu.

Boutekedjiret i saradnici (1999) su ispitivali koji je najbolji period za sakupljanje lista ruzmarina u Bibans regiji, Turska, za najveći prinos i najbolji kvalitet etarskog ulja. Utvrđeno je da sastav ulja varira u zavisnosti od perioda sakupljanja, odnosno u različitim fazama životnog ciklusa biljke. Najveći prinos etarskog ulja zabilježen je u fazi punog cvjetanja, pri čemu je izolovano ulje bogato monoterpenskim ugljovodonicima, oksigenovanim terpenima i seskviterpenskim ugljovodonicima. Glavna komponenta etarskog ulja lista ruzmarina je 1,8-cineol, čiji je sadržaj bio najveći u fazi početka cvjetanja, a smanjivao se u etarskom ulju izolovanom iz lista ruzmarina u punom cvjetanju i na kraju faze cvjetanja. Uočena varijabilnost u sastavu etarskog ulja odražava važne biološke promjene koje se dešavaju tokom različitih faza životnog ciklusa biljke.

Za kvalitet etarskog ulja glavna karakteristika su procenat jedinjenja sa kiseonikom. Za uzorak uzet sa teritorije opštine Nikšić, najveći procenat jedinjenja sa kiseonikom je u uzorku cvijeta ruzmarina (70,39%).

4.7. Antimikrobna aktivnost ruzmarina

Zloupotreba i prekomjerna upotreba antibiotika je dovela do otpornosti nekih patogena na njihovo dejstvo, i to je trenutno je jedna od najvećih globalnih prijetnji za javno zdravlje i razvoj. Zato su danas posebno interesantna istraživanja antimikrobnih agenasa iz aromatičnih i ljekovitih biljaka.

U ovom master radu disk-difuzionom metodom je ispitan antimikrobni efekat etarskog ulja rumarina u tri faze vegetativnog ciklusa (prije cvjetanja, tokom cvjetanja, nakon cvjetanja) kao i cvijeta ruzmarina.

U tabeli 9 su prikazani rezultati antimikrobnog disk-difuzionog testa za etarsko ulje ruzmarina dobijenog prije cvjetanja i nakon cvjetanja.

Tabela 9. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja ruzmarina prije cvjetanja i nakon cvjetanja

	<i>Etarsko ulje ruzmarina</i> (μl)					
	Prije cvjetanja			Nakon cvjetanja		
	1	3	5	1	3	5
	Zona inhibicije (mm)					
Mikroorganizam						
<i>Staphylococcus aureus</i>	33	42	51	21	36	40
<i>Escherichia coli</i>	21	43	47	14	31	36
<i>Bacillus subtilis</i>	25	40	43	16	27	34

Rezultati su pokazali da najjače dejstvo etarsko ulje ruzmarina ima periodu prije cvjetanja i to na bakteriju *Staphylococcus aureus*, gdje je zona inhibicije za količine ulja od 1μl, 3μl i 5μl bila 33mm, 42 mm i 51 mm, redom.

Etarsko ulje ruzmarina dobijeno od uzorka prije cvjetanja je imalo značajno manji efekat na drugi medicinski važan patogen *Echerichia coli* pri nižoj količini ulja (1μL), dok je aktivnost bila prilično visoka pri količini ulja od 3μl i 5μl (43 i 47 mm, redom). Dalje, etarsko ulje ruzmarina dobijeno od uzorka prije cvjetanja je pokazalo relativno slabiji efekat na *Bacillus subtilis* pri

manjoj količini ulja (1 μ L), dok je aktivnost bila prilično visoka pri količini ulja od 3 μ l i 5 μ l (27 mm i 34 mm).

Etarsko ulje sadrži složene mješavine fenola i terpena, međutim, malo se zna o efektu interakcije pojedinačnih sastojaka etarskih ulja na njihovu antimikrobnu aktivnost. Interakcije između sastojaka u etarskom ulju mogu dovesti do aditivnih, sinergističkih ili antagonističkih efekata (Stojanović-Radić i saradnici, 2010).

Rezultati u ovom master radu pokazuju da se dejstvo etarskog ulja ruzmarina na ispitivane mikroorganizme povećava sa povećanjem količine primijenjenog etarskog ulja. Ranijim istraživanjima je zaključeno da su komponente zbog kojih ruzmarin pokazuje antimikrobni efekat pineni, bornil acetat, kamfor i 1,8 cineol (Jiang, 2011).

Ounaissia i saradnici (2022) su došli do zaključka da etarsko ulje ruzmarina pokazuje antimikrobni efekat na gram pozitivne bakterije, i da ima potencijal u korišćenju prehrambenoj industriji.

U tabeli 10 prikazani su rezultati antimikrobnog disk-difuzionog testa etarskog ulja tokom cvjetanja i cvijeta ruzmarina.

Tabela 10. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja ruzmarina tokom cvjetanja i cvijeta ruzmarina

	<i>Etarsko ulje ruzmarina</i> (μ l)					
	Tokom cvjetanja			Cvijet ruzmarina		
	1	3	5	1	3	5
	Zona inhibicije (mm)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	36	42	24	37	40
<i>Escherichia coli</i>	18	30	37	17	28	35
<i>Bacillus subtilis</i>	21	28	35	21	26	33

Rezultati disk-difuzionog testa za etarsko ulje lista ruzmarina tokom cvjetanja pokazali su da povećanjem količine etarskog ulja povećava njegov efekat na ispitivane bakterije, a da je najjače dejstvo na bakteriju *Staphylococcus aureus* gdje se zona inhibicije kreće od 24 mm do 42 mm . Dalje, etarsko ulje dobijeno iz lista ruzmarina tokom cvjetanja pokazuje nešto slabiji efekat na

Escherichia coli, naročito primjenom manje količine ulja (1 μ l i 3 μ l), dok količina ulja od 5 μ l ima veći efekat i zona inhibicije iznosi 37 mm. Kada je u pitanju efekat na *Bacillus subtilis*, važi isto pravilo da pri povećanju količine ulja raste i antimikrobni efekat etarskog ulja tokom cvjetanja, a najveći je za 5 μ l etarskog ulja gdje je izmjerena zona inhibicije 35 mm.

Etarsko ulje cvijeta ruzmarina je imalo manji efekat na patogen *Echerichia coli* pri manjoj količini ulja (1 μ L i 3 μ L), dok je aktivnost bila viša pri količini od 5 μ l (35 mm). Dalje, etarsko ulje ruzmarina dobijeno od uzroka cvijeta ruzmarina je pokazalo slabiji efekat na *Bacillus subtilis* pri najnižoj koncentraciji ulja (1 μ L), dok je aktivnost bila relativno visoka pri količini od 3 μ L i 5 μ L (26 mm i 33 mm).

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja ruzmarina (prije cvjetanja, tokom cvjetanja, nakon cvjetanja i cvijet ruzmarina), dato u tabelama 9 i 10, pokazalo je da testirani mikroorganizmi imaju različitu osjetljivost prema etarskom ulju.

Dobijeni rezultati su pokazali da etarsko ulje ruzmarina dobijeno prije perioda cvjetanja pokazuje jaču antimikrobnu aktivnost na sve ispitivane bakterije u odnosu na etarsko ulje lista tokom i nakon cvjetanja i cvijeta ruzmarina, vjerovatno zbog većeg sadržaja jedinjenja sa kiseonikom kao što su 1,8 cineol (16,87%) i borneol (7,22%). Ove komponente djeluju tako što ometaju citoplazmu mikrobne membrane, što uzrokuje gubitak u visokoj nepropusnosti membrane za protone i veće jone (Jiang, 2011).

Palfi i saradnici (2018) sproveli su istraživanje o antimikrobnom efektu ruzmarina, anisa i lavande na rast bakterije *Colletotrichium coccodes*. Utvrđeno je da antimikrobna aktivnost etarskog ulja zavisi od koncentracije, odnosno primjenjene količine, ali i da antimikrobna aktivnost opada sa vremenom. Hezil i saradnici (2022) su sproveli istraživanje hemijskog sastava i antibakterijskog dejstva etarskog ulja *Rosmarinus officinalis* sa područja Alžira, protiv bakterijskih sojeva: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermis* i *Pseudomanase fragi*. Rezultati ovog rada potvrdili su aktivnost etarskog ulja *Rosmarinus officinalis* na testirane bakterijske sojeve.

Karadağ i saradnici (2019) ispitivali su antimikrobni efekat cvijeta ruzmarina. Koristili su metodu minimalne inhibitorne koncentracije i pokazali su da je etarsko ulje cvijeta ruzmarina najefikasniji protiv *S. aureus*, najviše zbog prisustva kamfora i 1,8 cineola.

Chama i saradnici (2022) su ispitivali dejstvo etarskog ulja dvije vrste samoniklog ruzmarina *Rosmarinus eriocalix* i *Rosmarinus officinalis* sa područja Alžira protiv tri patogene bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*). Rezultati su pokazali da etarsko ulje vrste *R. eriocalix* ima veću aktivnost u poređenju sa etarskim uljem vrste *R. officinalis* L. i da je aktivnost oba etarska ulja bila bila najveća protiv *P. aeruginosa*.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata u toku hemijskih i antimikrobnih ispitivanja etarskih ulja ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) dobijenih od različitih faza vegetativnog ciklusa (prije cvjetanja, tokom cvjetanja, cvijet ruzmarina i nakon cvjetanja), mogu se izvesti sledeći zaključci:

Prinos etarskog ulja lista ruzmarina se kretao od 1,2% za uzorak prije cvjetanja, 1% nakon cvjetanja dok je u toku cvjetanja dobijen najveći prinos od 1,4%. Dobijeno etarskog ulja je karakterističnog aromatičnog mirisa i blijedo žućkaste boje. Hidrodestilacijom cvijeta ruzmarina dobijeno je 0,8% etarskog ulja, blijedo žućkaste boje i aromatičnog mirisa.

Glavne komponente etarskog ulja lista ruzmarina uzorkovanog prije cvjetanja su α -pinen (17,27%), 1,8-cineol (16,87%), kamfor (11,79%), borneol (7,22%), kamfen (7,16%) i verbenon (5,07%). Najzastupljenije komponente u etarskom ulju ruzmarina u toku cvjetanja su: α -pinen (16,44%), 1,8-cineol (14,02%), kamfor (11,28%), borneol (9,01%), kamfen (6,43%) i β -mircen (3,44%). Glavne komponente su u etarskom ulju ruzmarina nakon cvjetanja: α -pinen (20,59%), 1,8-cineol (14,7%), kamfor (8,97%), kamfen (7,86%), borneol (5,65%) i bornil acetil etar (4,73%). Najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju cvijeta ruzmarina su: kamfor (17,19%), 1,8 cineol (15,16%), borneol (13,59%), α -pinen (11,03%), bornil acetil etar (8,38%), kamfen (6,54%) i verbenon (4,69%). Uočena varijabilnost u sastavu etarskog ulja odražava važne biološke promjene koje se dešavaju tokom različitih faza životnog ciklusa biljke.

Najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju ruzmarina dobijenom od sve četiri faze vegetativnog ciklusa su jedinjenja sa kiseonikom, zatim monoterpeni ugljovodonici dok su seskviterpeni zastupljeni u relativno maloj količini (1,49-2,24%).

Najveći sadržaj jedinjenja sa kiseonikom je zabilježen u uzorku prije cvjetanja ruzmarina (60,21%), zatim u uzorku cvijeta ruzmarina (59,39%), dok je nešto manji sadržaj ovih jedinjenja zabilježen je u uzorku tokom cvjetanja (56,1%) i najmanji za uzorak nakon cvjetanja ruzmarina (49,5%). Najveći sadržaj monoterpenih ugljovodnika zabilježen u uzorku ruzmarina u toku cvjetanja (42,41%), zatim nakon cvjetanja (46,31%) dok je niži sadržaj ovih jedinjenja u listu prije cvjetanja ruzmarina (39,12%) i cvijetu ruzmarina (37,02%).

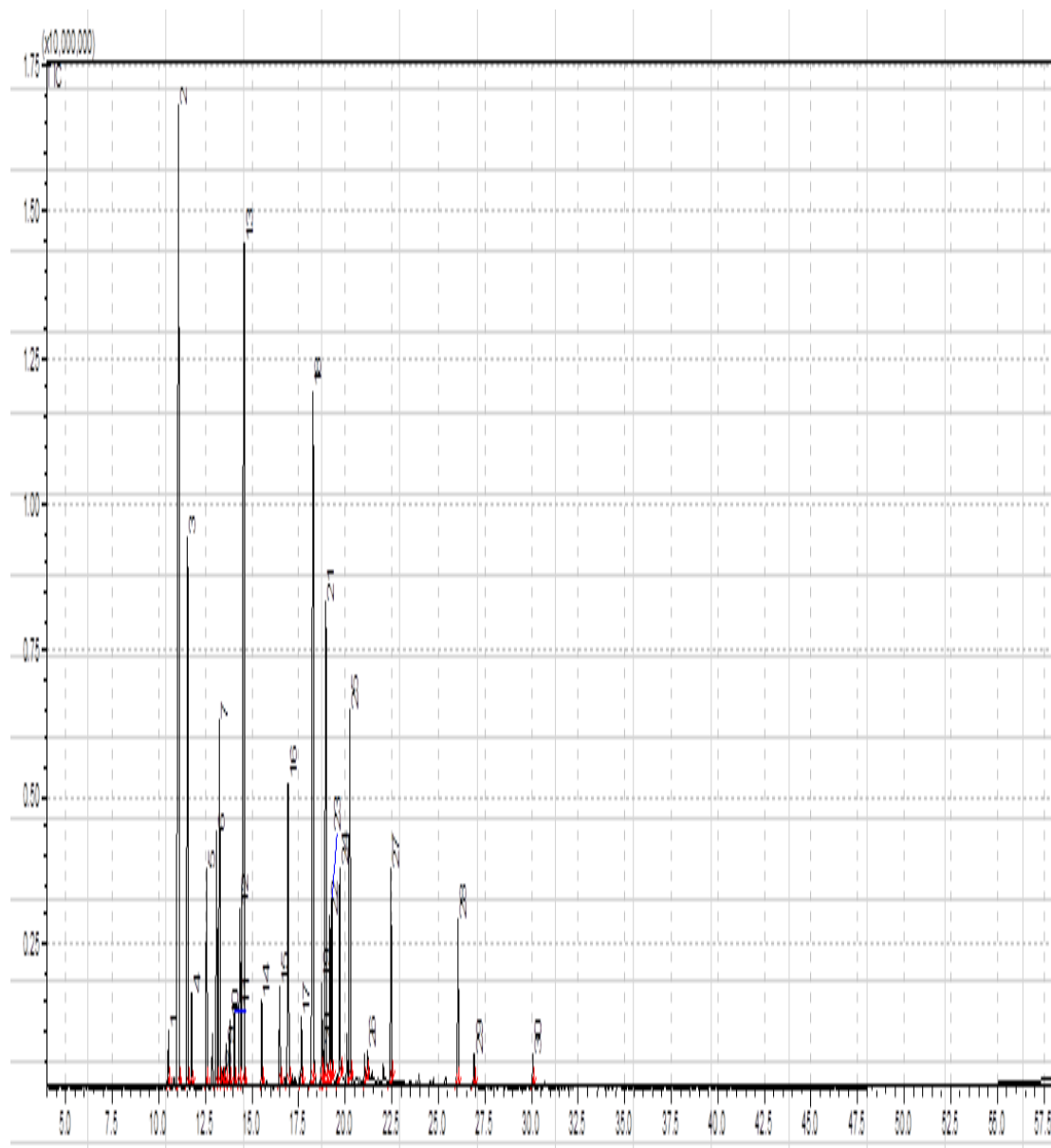
Najveći antibakterijski potencijal ima etarsko ulje ruzmarina dobijeno prije cvjetanja vjerovatno zbog većeg sadržaja jedinjenja sa kiseonikom kao što je 1,8 cineol i borneol. Dobijeni rezultati su pokazali da etarsko ulje ruzmarina dobijeno prije perioda cvjetanja pokazuje jaču antimikrobnu aktivnost na sve ispitivane bakterije u odnosu na etarsko ulje tokom i nakon cvjetanja, kao i cvijeta ruzmarina, vjerovatno zbog većeg sadržaja jedinjenja sa kiseonikom kao što su 1,8 cineol (16,87%) i borneol (7,22%).

Rezultati u ovom master radu pokazuju da vegetacioni ciklus biljke ruzmarin može značajno da utiče na prinos, hemijski sastav i antimikrobnu aktivnost etarskog ulja.

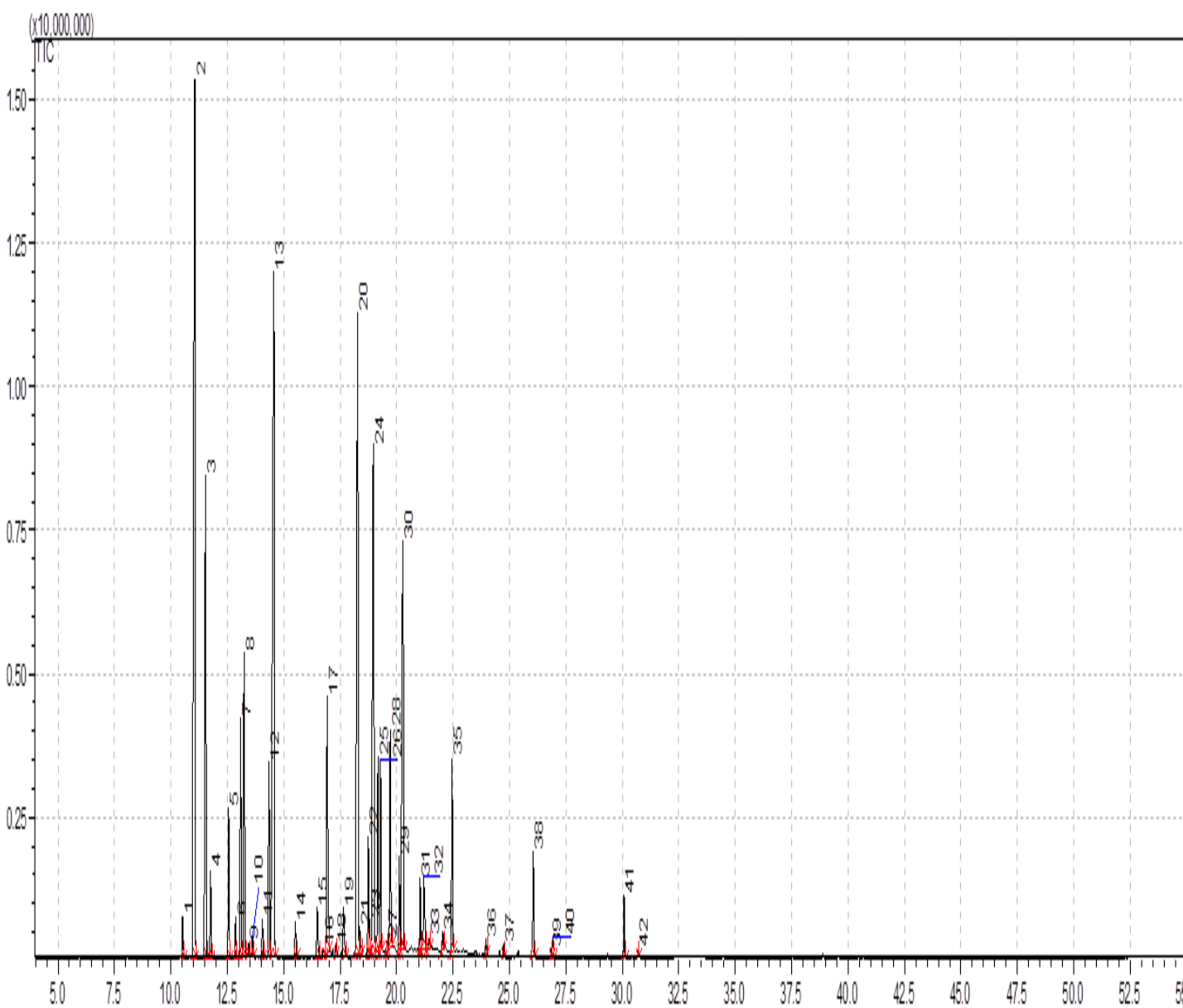
6.LITERATURA

7. PRILOG

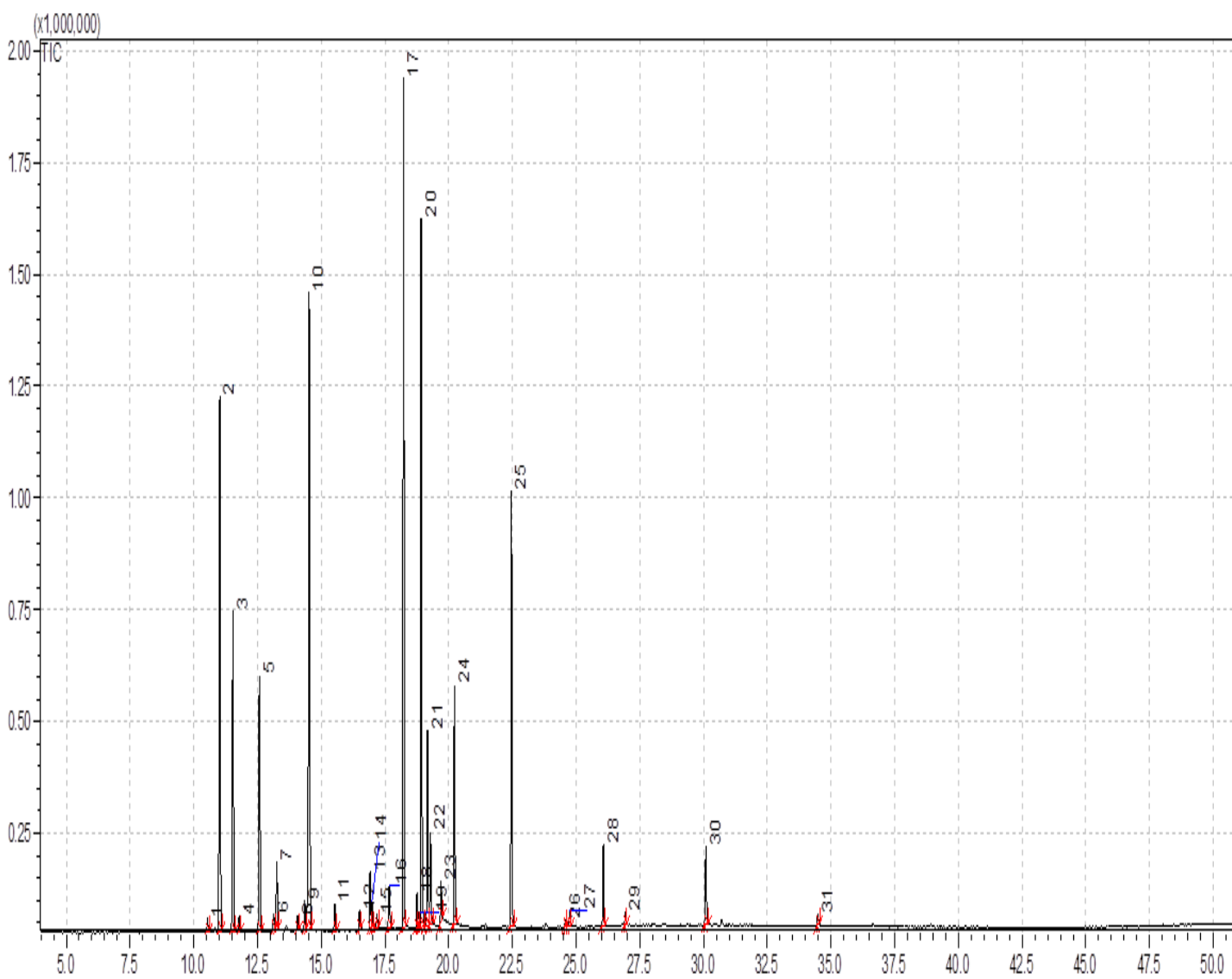
Slika 7: Prikaz GC-MS hromatogram etarskog ulja prije cvjetanja



Slika 8. Prikaz GC-MS hromatograma etarskog ulja tokom cvjetanja



Slika 9: Prikaz GC-MS hromatograma etarskog ulja cvijeta ruzmarina



Slika 10: Prikaz GC-MS hromatograma etarskog ulja ruzmarina nakon cvjetanja

