

Химикотехнологичен и металургичен университет

Факултет по химично и системно инженерство



Дипломна работа

на тема:

Биологична активност на отпадъчни фракции при дестилация на карамфил

За образователно- квалификационна степен

„Магистър”

Ръководител катедра: Доц. д-р инж. Иво Лалов

Научен ръководител: гл. ас. д-р инж. Невена Лазарова-Здравкова

Научен консултант: ас. инж. Йоана Стоянова

Дипломант: Катарина Арсов, фак.ном. МС1439

София, 2023г.

Благодарности

Настоящата дипломна работа е реализирана с финансовата подкрепа на Фонд научни изследвания към Министерство на науката и образованието (дог. КП-06-НЗ7/14).

Съдържание

Списък с таблици и фигури.....	6
Фигури.....	6
Таблици.....	6
Използвани съкращения :.....	8
2. Цел и задачи	11
3. Литературен обзор	12
3.1 Карамфилът като растение	12
3.2 Компоненти съдържащи се в карамфила.....	13
3.3 Видове отпадъчни фракции	15
3.3.1 Хидрозол.....	15
3.3.2 Казанен остатък	18
3.3.3 Изтощена растителна маса	19
3.4 Методи за получаване на етерично масло от карамфил	20
3.4.1. Парна дестилация (<i>steam distillation</i>).....	20
3.4.2. Хидродестилация (<i>hydrodistillation</i>).....	22
3.5. Биологична активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил.....	23

3.5.1 Антибактериална активност.....	23
3.5.1.1. Антибактериална активност на хидрозол от карамфил	23
3.5.1.2. Антибактериална активност на казанен остатък от карамфил.....	24
3.5.2. Антиоксидантна активност.....	24
3.5.2.1. Антиоксидантна активност на хидрозол от карамфил	24
3.5.2.2. Антиоксидантна активност на казанен остатък от карамфил.....	25
4.1. Материали и методи	25
4.1.1 Материали	25
4.1.2 Химикали и апаратура	26
4.2. Изследване на биологична активност.....	26
4.2.1. Агар-дифузионен метод	26
4.2.2 Метод <i>Microdilution in Broth</i> (метод на микроразреждане в бульон).....	28
4.2.3 DPPH метод.....	30
4.3 Изчисляване на антиоксидантната активност.....	33
5. Резултати и дискусия	33
5.1 Диск-дифузионен метод за изследване на антибактериалната активност на	33
казанен остатък и хидрозол от карамфил	33
5.2 Метод за изследване на антибактериалната активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил чрез метода на микроразреждане в бульон	34

5.3. Изследване на антиоксидантната активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил	36
6. Изводи	39
7. Заключение:	40
8. Използвана литература.....	41

Списък с таблици и фигури

Фигури

Фигура 1. Компоненти съдържащи се в карамфила [2]	15
Фигура 2. Принципна схема на парна дестилация [27]	21
Фигура 3. Принципна схема на хидродестилация [27]	22
Фигура 4. Биологичната активност на <i>S. aromaticum</i> и свързаните с него съединения [19]	23
Фигура 5. Схема на агар –дифузионен метод.....	28
Фигура 6. Спектрофотометър	31
Фигура 7.Проби по време на DPPH метода.....	31
Фигура 8. Експериментални данни и калибровъчна крива на неутрализиран DPPH радикал на 60-тата минута от карамфилов хидрозол (А) СН 1.2.4, (Б) СН 1.2.9	36
Фигура 9. Експериментални данни и калибровъчна крива на неутрализиран DPPH радикал на 60-тата минута от карамфилов казанен остатък (А) СН 1.2.4, (Б) СН 1.2.9.....	37

Таблици

Таблица 1. Компоненти съдържащи се в етерично масло от <i>S. aromaticum</i> , получено чрез парна дестилация [19, 20, 21].	14
Таблица 2. Химичен състав на хидрозола, получен чрез парна дестилация[20]	16
Таблица 3. Концентрации на изследваните проби карамфилов хидрозол 1.2.4 и 1.2.9 ..	32

Таблица 4. Концентрации на изследваните проби карамфилов казанен остатък 1.2.4 и 1.2.9	32
Таблица 5. Резултати от проведения диск-дифузионен метод	34
Таблица 6 . Резултати от метода микроразреждане в бульон с карамфилов хидрозол .	35
Таблица 7. Антиоксидантна активност на карамфиловият хидрозол 1.2.4. и 1.2.9. представена чрез EC_{50}	37
Таблица 8. Антиоксидантна активност на карамфиловият казанен остатък 1.2.4. и 1.2.9. представена чрез EC_{50}	38

Използвани съкращения :

DPPH - 2,2-Дифенил-1-(2,4,6-тринитрофенил) хидразин

Евгенол - (4-алил-2-метоксифенол)

GC-MS – масспектрометрия

HPLC –високоэффективна течна хроматография

1. Увод

Растенията са безценни за човешката цивилизация от векове. Някои техни забележителни качества, са способността да синтезират ароматни съединения, известни като етерични масла. Те се извличат от различни части на растението, като - листа, цветя, стъбла, корени и плодове. Получават се чрез дестилация, екстракция или студено пресоване. Те носят характерния аромат и вкус на растението, от което са получени и се използват за различни цели от хиляди години. Всяко етерично масло има уникална комбинация от химични съставки, които допринасят за неговия различен аромат и терапевтични свойства. Тези масла, ценени заради своите ароматни и терапевтични качества, придобиват популярност в различни индустрии и домакинства [1,2].

Що се отнася до добрите страни на етеричните масла, много от тях са биоразградими, което означава, че могат да се разградят естествено с течение на времето, без да причиняват дългосрочни вреди на околната среда. Някои етерични масла имат инсектицидни и репелентни свойства, което ги прави потенциална алтернатива на синтетичните пестициди в органичното земеделие и борбата с вредителите. Също така, етеричните масла се използват в ароматерапията и природните лекарства за различни здравословни цели. Едно от основните приложения на етеричните масла е в ароматерапията. Чрез правилната комбинация от терапевтични масла може да се въздейства благоприятно на човешкия организъм [3].

Въпреки че етеричните масла предлагат многобройни предимства, от решаващо значение е да се следят указанията за безопасност. Те влияят силно върху биологичните функции на човешкия организъм и трябва да се използват в умерени количества, правилно разреждени и тествани за потенциални алергии или чувствителност преди масова употреба. Използват се в парфюмерията, козметиката, производството на сапуни, за ароматизиране на храни и напитки, както и за добавяне на аромати към продукти. Широко приложение намират и в профилактика на различни заболявания. Етеричните масла са използвани като лекарство в миналото. Счита се, че най-ранните техники и методи, използвани за производството на етерични масла, са на Ибн ал-Байтар – лекар, фармацевт и химик.

Негативното влияние на маслата се крие в това, че производството може да изисква много ресурси. Необходими са значителни количества растителен материал, за да се получат малки количества масло, което може да окаже натиск върху растителните популации, ако не се управлява устойчиво. Неустойчивото събиране на растителни материали за производство на етерично масло може да доведе до унищожаване на местообитания и загуба на биоразнообразие в определени региони. Етеричните масла са сложни смеси от химични съединения и някои от тези съединения могат да имат неблагоприятни ефекти върху живота във водата и почвените микроорганизми, ако не се управляват или изхвърлят правилно. Неправилното изхвърляне може да доведе до замърсяване и да повлияе на местните екосистеми [3].

2. Цел и задачи

Целта на настоящата дипломна работа е да се изследва антибактериалната и антиоксидантна активност на отпадъчните фракции при производството на етерично масло от карамфил - хидрозол и казанен остатък. Във връзка с постигането на тази цел са поставени следните задачи:

- Изследване на антибактериалната активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил срещу *Bacillus subtilis* NBIMCC 3562 и *Escherichia coli* K12 407;
- Изследване на антиоксидантната активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил.

3. Литературен обзор

3.1 Карамфилът като растение

Карамфилът (*Syzygium aromaticum*) е подправка получена от изсушени цветни пъпки на определен вид дърво, принадлежащо към семейство *Myrtaceae*. Растението е местно за Малукските острови в Индонезия, но наскоро се отглежда на различни места по света. Карамфиловото дърво се състои от листа и пъпки (търговската част на дървото) и производството на цъфтящи пъпки започва четири години след засаждането [4].

Карамфилът се счита за една от подправките, които потенциално могат да се използват като консерванти в много храни, особено при преработката на месо, за да заменят химическите консерванти поради техните антиоксидантни и антимикробни свойства [5].

Растението съдържа голям брой биологично активни компоненти и има много интензивен аромат. Той се използва в традиционни китайски храни като подправка повече от 2000 години. Освен това, в традиционната китайска медицина карамфилът показва ефекти върху подобряването на храносмилането и потискането на растежа на микроорганизмите, което е доказано от съвременни фармакологични изследвания. Карамфилът привлича все по-силно изследователския интерес заради антисептичното си действие [6].

Parker и колектив разкриват антивирусната, антимикробната, противогъбичната, противораковата, антиоксидантната и противовъзпалителната активност на масло от карамфил и неговата основна активна съставка евгенол [7].

Sofia и колектив изследват антимикробната активност на няколко индийски подправки (джинджирил, чесън, мента, карамфил и канела). Освен това, Dorman и Deans оценяват антибактериалната ефикасност на мащерка, карамфил, здравец, индийско орехче, риган и черен пипер спрямо 25 щамове грам-отрицателни и грам-положителни бактерии [8,9,10].

В традиционната медицина карамфилът се използва при метеоризъм, оплаквания от лошо храносмилане и диария [11].

Евгенол (4-алил-2-метоксифенол), съединението, изолирано от *S.aromaticum* е документиран за неговата антивирусна ефикасност спрямо различни щамове на херпесвирус и вируса на хепатит С чрез действието му върху синтеза на вирусната ДНК чрез инхибиране на ензима на вирусната ДНК полимераза [5,12,13].

Също така, евгенолът е бил изследван и спрямо *Listeria monocitogenes* и *E. coli* и резултатите разкриват ефективността на евгенола за потискане на размножаването на тези микроорганизми [14].

Освен това Jirovetz и колектив изследват, че екстрактът от цветни пъпки на *S. aromaticum* показва антибактериална ефикасност спрямо бактериални изолати като *Bacillus*.

В допълнение, Oulkheir и колектив установяват, че масло от карамфил създава зона на инхибиране срещу *E. coli* от 16 mm и по-голяма зона на инхибиране (20 mm) срещу видове *Salmonella* [15,16,17].

Има данни, че етеричното масло от карамфил и евгенолът, получени от *S.aromaticum*, притежават полезни аналгетични, анестетични и антисептични ефекти и следователно често се използват в стоматологията [18].

Маслото от карамфил притежава качества подобряващи здравето на храносмилателната система и засилващи метаболизма [18,37].

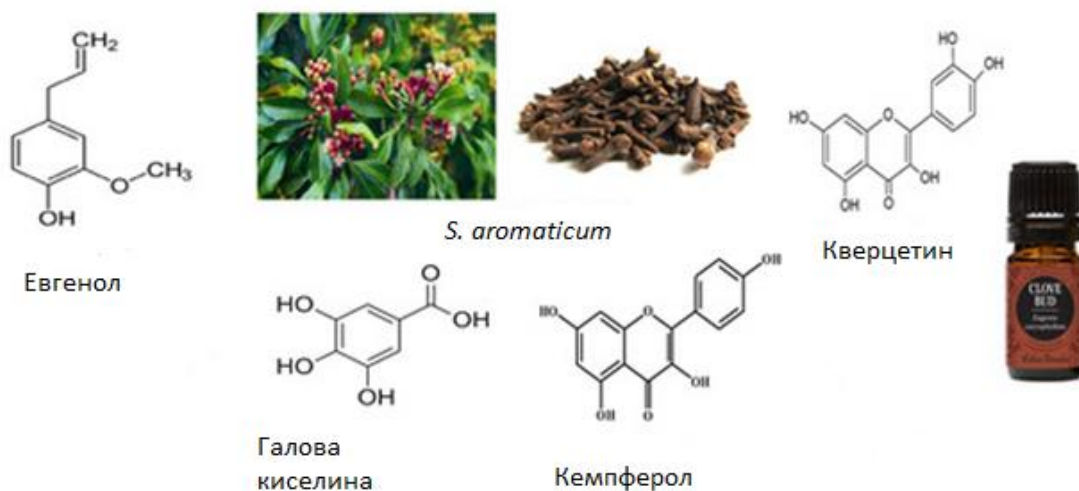
3.2 Компоненти съдържащи се в карамфила

Получаването на етеричното масло от карамфил, може да се получи чрез множество методи. Основните методи са парна и хидро дестилация. В **Таблица 1.** са представени компонентите получени през парна дестилация на *S.aromaticum*.

Таблица 1. Компоненти съдържащи се в етерично масло от *S. aromaticum*, получено чрез парна дестилация [19, 20, 21].

Химичен компонент/съединение	Съдържание [%]	Биологични свойства
Евгенол	89%	Основното активно съединение в карамфила, отговорно за техния характерен аромат и вкус. Притежава различни свойства- антимикробни, антиоксидантни, противовъзпалителни и аналгетични ефекти.
Ацетил евгенол	5-15 %	Структурно подобен на евгенола и допринася за цялостния аромат и вкус на карамфила. Ацетилевгенолът също проявява антимикробни и антиоксидантни свойства.
Бета- кариофилен	2-13 %	Сесквитерпеново съединение. Допринася за пикантния и дървесен аромат на карамфил и е изследван за противовъзпалителни и аналгетични ефекти.
Метил салицилат	0,1%	Естествено съединение в карамфила, което допринася за техния характерен аромат. Притежава аналгетични свойства и обикновено се използва в продукти за локално облекчаване на болката.
Танини		Група полифенолни съединения. Танините допринасят за стипчивия вкус на карамфила и притежават антиоксидантни и противовъзпалителни свойства.
Флавоноиди (кемпферол, кверцетин и рамнетин)		Клас растителни съединения, присъстващи в карамфила, които имат антиоксидантни и противовъзпалителни ефекти.
Фенолни киселини (галова киселина, кафеена киселина и фепулинова киселина)		Карамфилът съдържа различни фенолни киселини. Тези съединения допринасят за антиоксидантната активност на карамфила и могат да имат благоприятен ефект върху човешкото здраве.

На **Фигура 1.** са представени основните компоненти, съдържащи се в карамфила. Важно е да се отбележи, че точният състав и концентрация на тези компоненти може да варира в зависимост от фактори като сорта, условията на отглеждане и методите на обработка. Тези съединения работят заедно, за да осигурят отличителния вкус, аромат и потенциалните ползи за здравето, свързани с растителния вид [15].



Ш

Фигура 1. Компоненти съдържащи се в карамфила [2]

3.3 Видове отпадъчни фракции

Съществуват три специфични отпадъчни фракции, които се получават при дестилация на карамфил, а именно: хидрозол, казанен остатък и отработена/ изтощена растителна маса.

3.3.1 Хидрозол

Хидрозоите са водните разтвори, които остават след парна или хидродестилация на растителния материал. Химическият състав на хидрозоите може да варира значително в зависимост от използвания растителен материал, процеса на дестилация и др. Състоят се основно от вода, съставляваща по-голямата част от продукта. Съдържат набор от водоразтворими съединения, както и следи от етерични масла, които допринасят за техния уникален аромат и терапевтични свойства.

Различни аналитични методи, включително GC-MS (масспектрометрия), HPLC и спектрофотометрия, са използвани за определяне на химичния състав на карамфиловия хидрозол. В **Таблица 2.** е представен химичния състав на хидрозола, получен чрез парна дестилация. GC-MS позволява идентифициране и количествено определяне на летливи съединения, докато HPLC е полезен за анализиране на нелетливи съединения, като фенолни съединения.

Спектрофотометрията се използва за измерване на специфични съединения, като общо фенолно съдържание, предоставяйки ценна информация за антиоксидантния потенциал на хидрозола.

Таблица 2. Химичен състав на хидрозола, получен чрез парна дестилация [20]

Съединение	Процентно съдържание %
Евгенол	89.1%
Евгенил ацетат	9.4%
Чавикол	0,4%
Ванилин	0,3%
Кониферил алдехид	0,2%
Метилев салицилат	<0,1%
β-кариофилен	<0,1
α-кариофилен	<0,1%
Бензил бензоат	<0,1%

Хидрозолиите се използват като тоници за лице, естествени аерозоли и съставки във формули за грижа за кожата, като осигуряват нежно подхранване и подпомагане здравето на кожата [2].

Наличието на микроорганизми в хидрозолиите може да доведе до няколко проблема:

1. Намален срок на годност:

Микроорганизмите в хидрозолиите могат да предизвикат разваляне, което води до неприятна миризма, обезцветяване и намаляване на срока на годност на продукта.

2. Рискове за здравето:

Някои микроорганизми могат да бъдат патогенни и да причинят здравословни проблеми, ако замърсеният хидрозол се използва върху кожата или се погълне.

3. Променени свойства

Замърсяването може да промени химичния състав на хидрозолиите, засягайки техните терапевтични или ароматни свойства.

Замърсяване на микрофлората с хидрозоли може да възникне при определени условия и може да създаде различни рискове в зависимост от вида на включените микроорганизми и предназначението на хидрозола. Например, съставът на хидрозолиите може да не съответства на специфичните хранителни изисквания на растенията, което потенциално причинява дисбаланси или стрес.

Въвеждането на големи количества хидрозоли или други вещества в околната среда без подходящо разбиране и контрол може да има непредвидени последици върху местните екосистеми и биоразнообразието.

От изключителна важност е да споменем, че в някои региони неконтролируемото замърсяване на растения с вещества, които не са предназначени за земеделска или градинарска употреба, може да наруши екологичният баланс.

Ако хидрозолиите се прилагат върху повърхността на почвата в прекомерни количества или в райони с лош дренаж, те могат да доведат до повърхностно оттичане. Това може потенциално да транспортира хидрозолиите и всички разтворени съединения,

които те съдържат, в близки повърхностни водни тела, което в крайна сметка може да повлияе на качеството на подземните води.

Някои хидрозоли могат да съдържат естествени растителни химикали, включително компоненти на етерични масла. Ако бъдат освободени в значителни количества, тези вещества биха могли потенциално да проникнат в почвата и да проникнат в подпочвените води, което води до замърсяване. Степента на замърсяването ще зависи от специфичния химичен състав и неговата устойчивост в околната среда. Въвеждането на хидрозоли в подпочвените води може да промени рН, съдържанието на разтворен кислород и общото качество на водата.

Ефективното управление на отпадъците от хидрозол включва подходящи методи за третиране, като процеси на филтриране, разделяне или пречистване за отстраняване на примесите и стабилизиране на останалите съединения. Рециклирането или повторното използване на хидрозоли отпадъци може да допринесе за кръговата икономика и да намали общото въздействие върху околната среда [2,20].

3.3.2 Казанен остатък

Казанния остатък е страничен продукт, получен по време на процеса на парна дестилация, използван за извличане на етерично масло от карамфил. Той може да варира по състав в зависимост от вида масло и използвания метод на екстракция.

Специфичният състав на казанния остатък ще зависи от температурата и продължителността на нагряване, както и от общите условия на обработка. Някои от тези съединения могат да се разградят или да се трансформират в други съединения, когато са изложени на топлина. Също така е възможно някои летливи съединения да бъдат загубени по време на процеса на нагряване. В състава му влизат: евгенол и ацетилевгенол в най-големи количества, след това кариофилен, ванилин, евгенил ацетат, бета кариофилен, хумулен и метил салицилат [22].

Неправилното изхвърляне на казанния остатък може да има отрицателно въздействие върху околната среда. Остатъците могат да отделят органична материя, хранителни вещества и други съединения в околната среда, което потенциално засяга

качеството на почвата и водата. Освен това, разграждането на органичната материя в остатъка може да доведе до генериране на парникови газове, допринасящи за изменението на климата. Рециклирането и повторното използване на остатъка за други приложения може да бъде част от практиките за устойчиво управление на отпадъците. [22]

3.3.3 Изтощена растителна маса

Изтощената растителна маса се състои от различни растителни остатъци, като стъбла, листа, люспи или други неядливи части. Специфичният състав зависи от видовете растения, практиките на отглеждане и основната цел, за която растението е отгледано.

Фармацевтичната, козметичната и хранително-вкусовата индустрия всяка година генерират огромно количество изтощена растителна маса след извличане на ценни съединения от растителният материал.

Органичният характер на изчерпаната растителна маса я прави подходяща за компостиране. Компостът, получен от растителни остатъци, може да обогати почвеното плодородие, да подобри задържането на вода и да подобри цялостното здраве на почвата, когато се прилага върху земеделски полета или градини.

Усъвършенстваните технологии, като биорафинериите, могат да превърнат изтощената растителна маса в продукти с добавена стойност като химикали на биологична основа, биопластмаси или материали на биологична основа за различни индустриални приложения.

Годишно се генерират големи количества изтощена растителна маса, което изисква подходящи механизми за събиране, съхранение и изхвърляне, за да се избегне замърсяването на околната среда и отделянето на парникови газове по време на разлагането.

Неправилното изхвърляне или освобождаване на продукти, съдържащи евгенол, в околната среда може потенциално да доведе до замърсяване на подземните води. Това може да повлияе на местните водни запаси и екосистемите, зависещи от подпочвените води. Евгенолът може да се натрупа в организмите с течение на времето. Ако попадне в хранителните вериги чрез замърсени водни източници, може да се прехвърли от един

организъм в друг. Това биоакмулиране може да доведе до по-високи концентрации на евгенол в определени видове, което потенциално засяга здравето им и тези, които ги консумират. Високите концентрации обаче могат да бъдат токсични [23].

3.4 Методи за получаване на етерично масло от карамфил

Дестилацията е основния метод за добиване на етерични масла. Тя може да бъде парна дестилация (извличането се извършва като изходната суровина контактува с водна пара) и водна дестилация (извличането се извършва като изходната суровина контактува с вода). Дестилацията е процес на разделяне на течна еднородна смес на съставните ѝ компоненти в резултат на разпределянето им между течността и контактуващата с нея парна фаза. Под техника на дестилация се разбира изпаряване на течност в един апарат, кондензация на парите и охлаждане на кондензата в друг и събиране на получената течност (дестилат) в трети. Процесът се основава на различната летливост на парите на отделните компоненти при една и съща температура. Дестилацията е метод, приоритетен за извличане на етерични масла от цветни и тревни култури [24].

3.4.1. Парна дестилация (*steam distillation*)

Парната дестилация е процес, който включва отделянето на летливи съединения от нелетливи вещества с помощта на пара. Парната дестилация е особено ефективна за извличане на чувствителни към топлина съединения, като етерични масла, които могат да бъдат повредени или променени при високи температури. Използва се за изолиране на етерично масло чрез понижаване на точката му на разлагане. Чрез понижаване на степента на кипене на органичните съединения на маслото, увреждането на чувствителните към топлина компоненти е сведено до минимум.

Карамфила се поставя в дестилатор снабден с термокамера, където температурата и налягането се регулират внимателно, за да се предотврати разрушаването на компонентите му. Твърде високото налягане може да доведе до твърде силен аромат, подобен на химикал. Твърде високите температури биха могли потенциално да намалят терапевтичните свойства на маслото.

Растителния материал се нагрява и генерираната пара носи летливите компоненти със себе си, докато се издига. След това парата и изпарените съединения преминават през кондензатор, където се охлаждат и кондензират обратно в течна форма. (В кондензатора непрекъснато се подава воден поток за охлаждане на сместа). Получената смес, известна като дестилат се събира в отделен съд. Нелетливите компоненти се оставят в оригиналната колба за по-нататъшно използване.

Евгенолът може да бъде изолиран сравнително лесно от карамфил с помощта на техниката на парна дестилация. Топлината и парата разрушават структурата на растителната клетка, което способства за освобождаване на етеричното масло. Полученият дестилат е смес от масло и вода и тъй като етеричните масла са водонеразтворими, т.е. лесно могат да бъдат отделени. При дестилацията с водни пари се получава бинерна система (система от несмесващи се и не взаимодействащи си течности), която се характеризира с точка на кипене по-ниска от точката на кипене на всяка една от течностите поотделно. При дестилация с водна пара, етеричните масла дестилират при температура под 100°C [24].

Карамфиловото масло има по-висока плътност от водата, пада на дъното и може да бъде отделено внимателно чрез поставяне на тънка игла за извличане на маслото. На **Фигура 2.** е показана принципна схема на парна дестилация.



Фигура2. Принципна схема на парна дестилация [27]

3.4.2. Хидродестилация (*hydrodistillation*)

Хидродестилацията е още един метод за извличане на етерични масла и ароматни съединения от растителни материали, като листа, цветя, стъбла и семена. Това е традиционна техника, използвана за изолиране на летливи компоненти от ботанически източници и обикновено се използва при производството на етерични масла за различни цели, включително парфюмерия, ароматерапия и ароматизиране.

Процесът включва дестилационен апарат, състоящ се от облодънна колба, охлаждащ с вода кондензатор и съд за събиране. Растителният материал се поставя в колбата с вода и се затопля. Водата се нагрява в колбата и се генерира пара. Докато парата се издига през растителния материал, пренася летливи съединения от клетките на растението. Парата, заедно с изпареното етерично масло и ароматни съединения, се движи нагоре през дестилационния апарат и навлиза в кондензатора. В кондензатора парата се охлажда и кондензира обратно в течно състояние. Етеричните масла и ароматните съединения, присъстващи в парата, също се кондензират заедно с водата. Тъй като маслото и водата не се смесват, кондензираната смес се състои от два слоя: слой етерично масло и слой вода. Тези слоеве могат да бъдат разделени поради различната им плътност [25,26]. На **Фигура 3.** е показана принципна схема на хидро дестилация.



Фигура 3. Принципна схема на хидродестилация [27]

3.5. Биологична активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил

На **Фигура 4.** е представена схематично биологичната активност на *S. aromaticum* и свързаните с него съединения. Както бе споменато по-горе, мнозина изследователи са изучавали антибактериалната и антиоксидантната активност на карамфиловото масло. Особено внимание е обърнато на основната съставка на карамфиловото масло- евгенола.



Фигура 4. Биологичната активност на *S. aromaticum* и свързаните с него съединения [19]

3.5.1 Антибактериална активност

3.5.1.1. Антибактериална активност на хидрозол от карамфил

S. aromaticum е богат на много фитохимикали, както следва: сесквитерпени, монотерпени, въгледороди и фенолни съединения. Евгенилацетат, евгенол и β -кариофилен са най-значимите фитохимикали в карамфиловото масло. Фармакологично, *S. aromaticum* е изследван спрямо различни патогенни паразити и микроорганизми, включително патогенни бактерии, паразити *Plasmodium*, *Babesia*, *Theileria*, *Herpes simplex* и вируси на хепатит С. Няколко научни екипа докладват за аналгетичната, антиоксидантна, противоракова, антисептична, антидепресивна, спазмолитична, противовъзпалителна, антивирусна, противогъбична и антибактериална активност на евгенол срещу няколко

патогенни бактерии, включително метицилин-резистентни *Staphylococcus epidermidis* и *S. aureus* [19,28,29].

Има данни, че хидрозол от карамфил може да предизвика инхибирането на растеж на бактерии. Може да денатурира протеини и реагират с фосфолипидите в клетъчната мембрана. Той също така засяга транспорта на йони и АТФ и променя профила на мастни киселини на различни бактерии [29].

3.5.1.2. Антибактериална активност на казанен остатък от карамфил

Тъй като казанния остатък съдържа в състава си евгенол, ацетилевгенол, кариофилен итн., той подобно на хидрозола, може да предизвика инхибиране на растежа на някои бактерии, изменения в структурата на клетъчната мембрана, размножаването на различни видове микроорганизми итн., което показва че той също така притежава антибактериална активност.

3.5.2. Антиоксидантна активност

Антиоксидантите играят решаваща роля в защитата на живите организми от оксидативен стрес и борбата със свободните радикали, които могат да доведат до увреждане на клетките и различни хронични заболявания.

3.5.2.1. Антиоксидантна активност на хидрозол от карамфил

Карамфиловият хидрозол е богат на биоактивни съединения, включително евгенол, кариофилен и флавоноиди. Сред тях евгенолът е идентифициран като основният компонент, отговорен за антиоксидантната активност на карамфиловия хидрозол. Евгенолът действа като уловител на свободните радикали, като ефективно неутрализира реактивните кислородни видове и проявява потенциални терапевтични ефекти срещу заболявания, свързани с оксидативния стрес. Като се имат предвид антиоксидантните свойства на карамфиловия хидрозол, той притежава потенциал за насърчаване на здравето и предотвратяване на окислително увреждане. Проучванията показват, че карамфиловият хидрозол може да допринесе за намаляване на маркерите на оксидативния стрес и възпалението, което го прави ценна хранителна добавка или естествено лекарство.

Необходими са обаче допълнителни *in vivo* проучвания, за да се потвърди неговата ефикасност и безопасност [30].

Антиоксидантната активност на карамфиловия хидрозол отваря възможности за различни индустриални приложения. Може да се използва като естествен консервант в хранително-вкусовата и козметичната промишленост за удължаване на срока на годност и поддържане на качеството на продукта. Освен това, включването на хидрозол от карамфил във фармацевтични формулировки може да подобри стабилността и антиоксидантните свойства на лекарствата.

След третиране с евгенол, производството на реактивни кислородни видове и активността на три антиоксидантни ензима (супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и каталаза) се увеличават в *S. aureus* клетки и в крайна сметка довеждат до клетъчна апоптоза поради прекомерен оксидативен стрес [19,31].

3.5.2.2. Антиоксидантна активност на казанен остатък от карамфил

Тъй като казанния остатък е богат най-вече на евгенол, ацетилевгенол и кариофилен, той може да улавя свободните радикали и да прояви антиоксидантна активност. Това негово свойство го прави използваем в хранително-вкусовата промишленост, фармацевтичните проучвания, козметичната индустрия итн.

4. Експериментална част

4.1. Материали и методи

4.1.1 Материали

Масло от карамфил (получено в катедра „Химично инженерство“)

Тест-култури *Bacillus subtilis* 3562 и *Escherichia coli* K12

Етанол (99,9 % - Валерус)

2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) реагент

Автоматични пипети

Дискчета с диаметър 6 mm

Епруветки или ямки за микроплаки

Пипети

4.1.2 Химикали и апаратура

Инкубатор - EnvironmentalShaker – Incubator ES-20/60

Термостат - BINDER21

Сух стерилизатор – BINDER

Автоклав

MicroplateReader PPC 142 - PKL® PoklerItalia

Турбидиметър – McFarlandDensitometer DEN-1B, Grant-bio, S/N:05010418110423

Аналитична везна – Sartoriusanalytic;

Вортексмиксер BOECO

Спектрофотометър – T70 UV/VIS Spectrometer, PG InstrumentsLtd

4.2. Изследване на биологична активност

4.2.1. Агар-дифузионен метод

Този метод е широко използвана техника в микробиологията за определяне на антимикробната активност на вещества срещу микроорганизми. Това е качествен метод, който осигурява начин за оценка на ефективността на антибиотици, антисептици, дезинфектанти и други антимикробни средства.

Обикновено за този метод се използват петрита с хранителна агарова среда. Агарът се приготвя съгласно инструкциите на производителя или чрез разтваряне на агар на прах в подходяща хранителна среда. Средата се стерилизира и се излива в стерилни петриеви стъкла, като се оставя да се втвърди.

Инокулиране на тестови организми:

Приготвя се стандартизирана суспензия от тествания микроорганизъм. Тази суспензия обикновено се коригира, за да съответства на 0,5 McFarland, който представлява специфична клетъчна плътност. Суспензията се нанася равномерно по повърхността на агара с помощта на шпатула.

Измерване на зоните на инхибиране:

След инкубация, плаките се изследват за наличие на ясни зони около ямките, което показва инхибиране на микробния растеж. Диаметърът на тези зони се измерва с линейка или калибриран четец на зони. По-големите зони на инхибиране обикновено показват по-висока антимикробна активност.

Размерът на зоната на инхибиране се сравнява със стандартните интерпретативни критерии или референтни стойности, за да се определи чувствителността или устойчивостта на микроорганизма към тестваното вещество.

Важно е да се отбележи, че агар-дифузионния метод има някои ограничения. Предоставя качествени резултати и не дава информация за минималната инхибираща концентрация на тестваното вещество. Освен това фактори като дълбочината на агара, pH и условията на инкубация могат да повлияят на дифузията на антимикробния агент и, следователно, на размера на зоната на инхибиране.

От петрито с развитите щамове избираме по възможност единична колония и я пресяваме внимателно в наклонена колба от 300 mL (пълна с 50 mL течна среда – NB). На границата между течността и въздуха размиваме взетата с йозе култура. Пресятата култура поставяме в термостат при 30°C.

В нашия случай предкултурата беше приготвена като в течната хранителна среда (50 mL) беше поставена единична колония от щамовете. След това щамовете бяха инкубирани за 18 h при 30°C за *B. subtilis* 3562 и 37°C за *E. Coli* K12. Културата се приготвя като към 50 mL от течната хранителна среда се прибавя 500 µL от предкултурата, след което се поставят в инкубатор за 18 часа при същите условия.

За измерването на инхибиторните зони бяха използвани филтърни дискчета, напоени с 6 μL от карамфиловия хидрозол/казанния остатък. След това бяха разпределени върху петритата с хранителна среда, с предварително посети 100 μL от културата. За всяко петри бяха използвани по 4 филтърни дискчета, 3 от които бяха напоени със съответната проба и 1 – с дестилирана вода (контрола). След това бяха поставени в термостат за още 24 h. На следващия ден бяха измерени инхибиторните зони. На фигура 5. е приказана схема на агар-дифузионния метод.



Фигура5. Схема на агар –дифузионен метод

4.2.2 Метод *Microdilution in Broth* (метод на микроразреждане в бульон)

Методът се използва за измерване на *invitro* активността на антимикробно вещество срещу бактериални клетки. За целта използваме Microplate Reader с 96- ямкова плака. Антимикробните агенти, които ще се тестват, се приготвят като серия от разреждания в подходяща растежна среда. В 96 ямковата плака, всяка колона съдържа различен антимикробен агент в различни концентрации. Най-високата концентрация обикновено се поставя в първата ямка на колоната, а следващите ямки съдържат прогресивно по-ниски концентрации.

Инокулиране на тестови организми:

Приготвя се стандартизирана суспензия от тествания микроорганизъм. Тази суспензия обикновено се коригира, за да съответства на мътността на стандарт 0,5 McFarland, представляващ специфична клетъчна плътност. Малък обем от

стандартизираната суспензия се добавя към всяка ямка на микротитърната плака, включително контролни ямки без антимикробен агент.

Инкубация:

Микротитърната плака се инкубира при оптимална температура за растежа на тестовия организъм. Инкубационният период може да варира в зависимост от организма и антимикробния агент, който се тества.

След инкубацията се оценява растежът на микроорганизма във всяка ямка. Това може да стане визуално чрез проверка на мътноста или чрез използване на допълнителни методи като добавяне на цветен индикатор или измерване на оптичната плътност с помощта на спектрофотометър.

Този метод позволява количествено определяне на инхибиторната активност на антимикробните агенти, предоставяйки ценна информация за определяне на подходящи дози и оценка на ефективността на различни антимикробни съединения. Това е универсална и широко използвана техника при тестване за антимикробна чувствителност.

В нашия случай от петрито с развит *B. subtilis* 3562 избираме по възможност единична колония и я пресяваме внимателно в наклонена колба от 300 mL (пълна с 50 mL течна среда – NB). На границата между течността и въздуха размиваме взетата с йозе култура. Пресятата култура поставяме в термостат при 30°C.

Изваждаме предкултурата от термостата. За провеждането на експеримента използваме ПК на 18-я час. В епруветка с капаче разреждаме чрез турбидиметър бактериалният инокулум до $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (0,5 McFarland). За определяне на антибактериална активност на карамфилов хидрозол използваме пробите CH1.2.4. и CH1.2.9.

По време на експеримента използваме два вида хранителни среди – първата се приготвя с дестилирана вода и NB, а втория вид хранителна среда – с 2 вида разтвор на карамфилов хидрозол (CH1.2.4 и CH1.2.9.), давайки възможност за допълнително разреждане на тестваните агенти. Контролни проби се приготвят в стандартна NB среда.

Бактериалният растеж беше отчетен при дължина на вълната 630 nm в началото на експеримента, на 6-ия и на 24-ия час от култивирането. Резултатите са показани в **Таблица 6.**

4.2.3 DPPH метод

Методът DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) е широко използван спектрофотометричен анализ за определяне на антиоксидантната активност на съединенията. Той измерва способността на антиоксиданта да улавя свободните радикали и да неутрализира техните вредни ефекти. Анализът се основава на редукция на стабилния DPPH радикал от антиоксиданта, което води до промяна на цвета, която може да бъде измерена спектрофотометрично. [17,31]

Изходният разтвор на DPPH се приготвя чрез разтварянето му в подходящ разтворител, обикновено етанол или метанол. Разтворът трябва да бъде прясно приготвен, тъй като DPPH е чувствителен към светлина и може да се разгради с времето.

Пробата или съединението, което се тества за антиоксидантна активност, се разтваря или разрежда в подходящ разтворител до желана концентрация. Важно е да се избере диапазон на концентрация, който позволява откриването на антиоксидантна активност, като същевременно се гарантира, че пробата е в линейния диапазон на анализа.

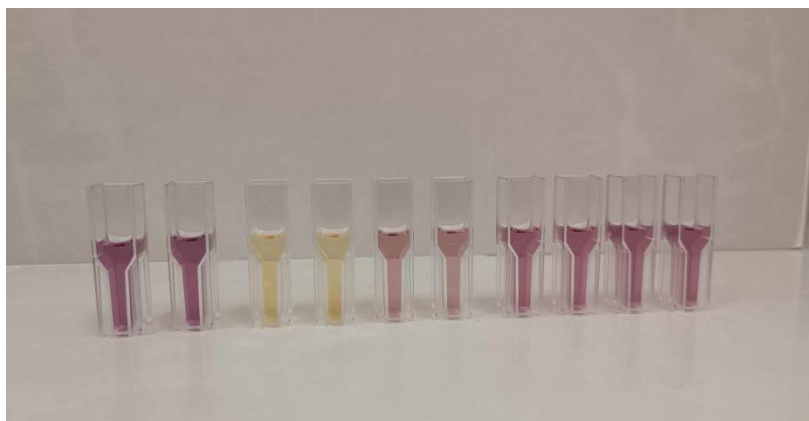
Равни обеми от пригответия разтвор на DPPH и тестовата проба се смесват заедно в ямка на кювета или микроплака. Сместа от DPPH и тестовата проба се оставя да се инкубира на тъмно за определен период от време. През това време присъстващият в пробата антиоксидант реагира с DPPH радикала, което води до намаляване на интензитета на цвета. След инкубационния период абсорбцията на сместа се измерва спектрофотометрично при определена дължина на вълната, обикновено около 517 nm. Спектрофотометърът измерва оставащия нереагирал DPPH, който е обратнопропорционален на антиоксидантната активност на пробата. По-ниска абсорбция показва по-висока антиоксидантна активност. На **Фигура 6.** е показан спектрофотометъра, използван за изработване на настоящата дипломна работа.

Антиоксидантната активност на пробата може да се сравни с тази на референтните антиоксиданти или контролните проби. По-високите проценти на отстраняване на DPPH показват по-силна антиоксидантна активност.



Фигура 6. Спектрофотометър

Методът DPPH е прост и бърз анализ за оценка на антиоксидантния капацитет на различни съединения, включително природни продукти, растителни екстракти и синтетични антиоксиданти. Въпреки това, трябва да се отбележи, че DPPH анализът осигурява цялостна мярка за антиоксидантна активност и не предоставя информация за специфичния механизъм на действие или кинетиката на антиоксидантните реакции. DPPH метода се определя с помощта на спектрофотометър показан на фигура 6. На **Фигура 7**. Са показани пробите по време на метода.



Фигура 7.Проби по време на DPPH метода

За да се определи антиоксидантната активност на изследваните отпадъчни фракции е нужно да се приготви разтвор на DPPH в абсолютен етанол (99.9%) с концентрация 0,1 mM, който да има абсорбция 0,8 – 0,9 Au. Следват разреждания на приготвеният разтвор, за да се достигне до 0,878 Au. Приготвени са разтвори на изследваните проби на карамфиловият хидрозол (1.2.4. и 1.2.9) и карамфиловият казанен остатък (1.2.4 и 1.2.9.) със следните концентрации преставени съответно в **Таблица 3.** и **Таблица 4.** За приготвянето на разредените проби на казанния остатък е използван абсолютен етанол (99.9%), а за разреждането на хидрозола – дестилирана вода

Таблица 3. Концентрации на изследваните проби карамфилов хидрозол 1.2.4 и 1.2.9

Проба	Излседвани концентрации, mg (карамфилов хидрозол) / mL (проба)
Карамфилов хидрозол 1.2.4.	5.67; 2.13; 1.62
Карамфилов хидрозол 1.2.9.	8.21; 2.05; 1.56; 1.31

Таблица4. Концентрации на изследваните проби карамфилов казанен остатък 1.2.4 и 1.2.9

Проба	Излседвани концентрации, mg (карамфилово масло) / mL (проба)
Карамфилов казанен остатък 1.2.4.	1.317; 0.549; 0.4116; 0.3294; 0.0329
Карамфилов казанен остатък 1.2.9.	0.851; 0.6806; 0.3403; 0.034

Към 1.5 mL разтвор на DPPH се добавят 0.05 mL от изследваната проба в съответната концентрация. Като контрола се приготвя разтвор, съдържащ 1.5 mL DPPH и 0.05 mL абсолютен етанол. Всяка проба е направена с по две повторения. Като бланка за всички анализирани проби се използва 1.55 mL абсолютен етанол.

Абсорбцията на изследваните проби се измерва при 517 nm през 15 минути в продължение на 1 час (измервания на 0, 15, 30, 45 и 60-та минута).

4.3 Изчисляване на антиоксидантната активност

Способността на пробите да обезвреждат DPPH-радикала е определена с помощта на **Формула 1.** и **Формула 2.**, изразена в %:

$$\% \text{ неутрализиран DPPH} \bullet = \frac{A_c - A_s}{A_c} 100 \quad (\text{Формула 1.})$$

$$\% \text{ нереагирал DPPH} \bullet = 100 - \% \text{ неутрализиран DPPH} \bullet \quad (\text{Формула 2.})$$

където,

A_s – абсорбцията на пробата;

A_c – абсорбцията на контролата;

Антиоксидантната активност е охарактеризирана чрез EC_{50} стойността, която представлява концентрацията, нужна, за неутрализирането на 50% от свободния DPPH радикал. В **Таблица 9.** са представени резултатите за EC_{50} на карамфиловият хидрозол (1.2.4. и 1.2.9.) и в **Таблица 10.** резултатите за EC_{50} на карамфиловият казанен остатък (1.2.4. и 1.2.9.).

5. Резултати и дискусия

5.1 Диск-дифузионен метод за изследване на антибактериалната активност на казанен остатък и хидрозол от карамфил

Казанен остатък и хидрозол от карамфил бяха тествани за антибактериална активност срещу *E. coli* K12 (тест-култура за Г- отрицателни бактерии) и *B. subtilis* 3562 (тест-култура за Г- положителни бактерии). След проведения експеримент, съгласно посочения в експерименталната част метод (точка 4.2.1), бяха отчетени зоните на инхибиране. На 24-ти час бяха отчетени резултатите с прилагане на хидрозол от карамфил и казанен остатък от карамфил.

Резултатите от теста са приказани в **Таблица 5.** и показват липса на антибактериална активност съответно липса на зони на казанния остатък и хидрозол от карамфил спрямо двата щама.

Таблица 5. Резултати от проведения диск-дифузионен метод

Зони на инхибиране		
	<i>Escherichia coli</i> K12	<i>Bacillus subtilis</i> 3562
Хидрозол от карамфил	-	-
Казанен остатък от карамфил	-	-

Oulkheir и колектив установяват, че масло от карамфил създава зона на инхибиране срещу *E. coli* от 16 mm и по-голяма зона на инхибиране (20 mm) срещу видове *Salmonella* [15, 16, 17].

Група учени изследва масло от карамфил срещу грам-отрицателни изолати. Най-добрата антибактериална активност е показана срещу видовете *Proteus* с 19 mm зона на инхибиране, 0,39 mg/ml минимална инхибираща концентрация и 0,19 mg/ml минимална бактерицидна концентрация [33].

5.2 Метод за изследване на антибактериалната активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил чрез метода на микроразреждане в бульон

Хидрозолът и казанният остатък от карамфил бяха тествани за антибактериална активност срещу двата моделни щама и чрез метода на микроразреждане в бульон, описан в точка 4.2.2. Резултатите от проведения опит са нанесени в **Таблица 6.**

Таблица 6 . Резултати от метода микроразреждане в бульон с карамфилов хидрозол

	Clove Hydrosol 1.2.4.						Clove Hydrosol 1.2.9.					
	μL (Clove Hydrosol 1.2.4. solution)/ μL (sample)						μL (Clove Hydrosol 1.2.9. solution)/ μL (sample)					
	0.67		0.55		0.44		0.67		0.55		0.44	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
	Growth reduction [%]											
<i>B.subtilis</i> 3652	88.96	95.17	74.81	89.8	67.76	88.65	88.82	89.87	88.32	89.67	87.39	88.44
<i>E.coli</i> K12	85.35	89.77	87.61	92.64	91.33	93.37	96	94.73	93.62	94.19	79.39	81.94

Резултатите от теста показват наличие на антибактериална активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил при *Bacillus subtilis* 3562 и *E.coli* K12.

Най-високата антибактериална активност на карамфиловия хидрозол 1.2.4.(95.17%) е отчетена при *B.subtilis* 3652 на 24-ия час при концентрация 0.67 μL , а пък най-високата антибактериална активност на карамфиловия хидрозол 1.2.9. (96%) е отчетена при *E.coli* K12 на 4-ия час при концентрация 0.67 μL . Това също така е и най-високата антибактериална активност отчетена с помощта на метода на микроразреждане с бульон.

Що се отнася до най-ниската антибактериална активност, тя е отчетена на 4-ия час при карамфилов хидрозол 1.2.4. с концентрация 0.44 μL и е в размер на 67.76%.

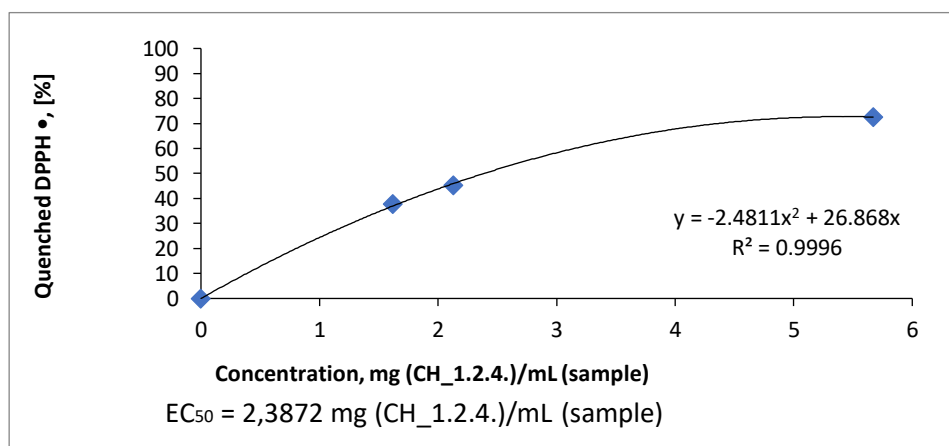
Проучване, публикувано в списание Oral Microbiology & Immunology, съобщава, че маслото от карамфил е ефективно при кандида и чревни паразити и може да се използва при лечението им [34].

5.3. Изследване на антиоксидантната активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил

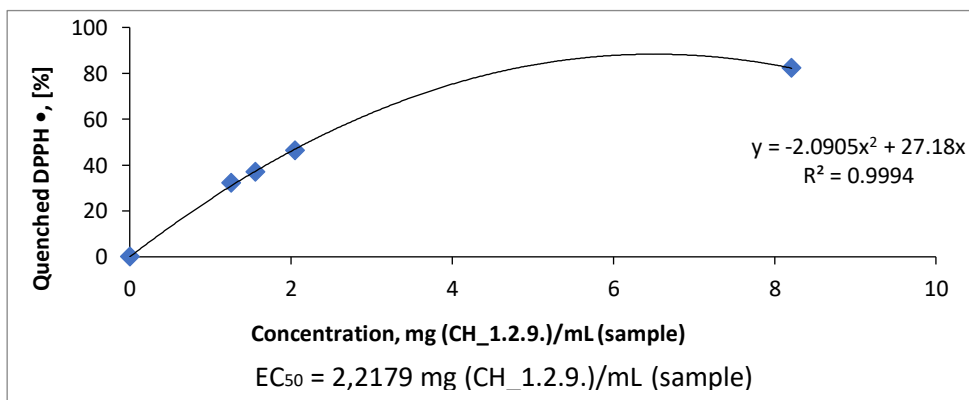
Анализът беше проведен съгласно използваната методика, описана в точка 4.2.3. При провеждане на експеримента бяха отчетени показанията на абсорбцията на всяка проба при дължина на вълната 517 nm и посредством Формула 2 бяха изчислени стойностите на нереагиращия DPPH в %.

На **фигура 8.** са приказани експериментални данни и калибровъчна крива на неутрализиран DPPH радикал на 60-тата минута от карамфилов хидрозол (А) СН 1.2.4, (Б) СН 1.2.9

(А)



(Б)



Фигура 8. Експериментални данни и калибровъчна крива на неутрализиран DPPH радикал на 60-тата минута от карамфилов хидрозол (А) СН 1.2.4, (Б) СН 1.2.9

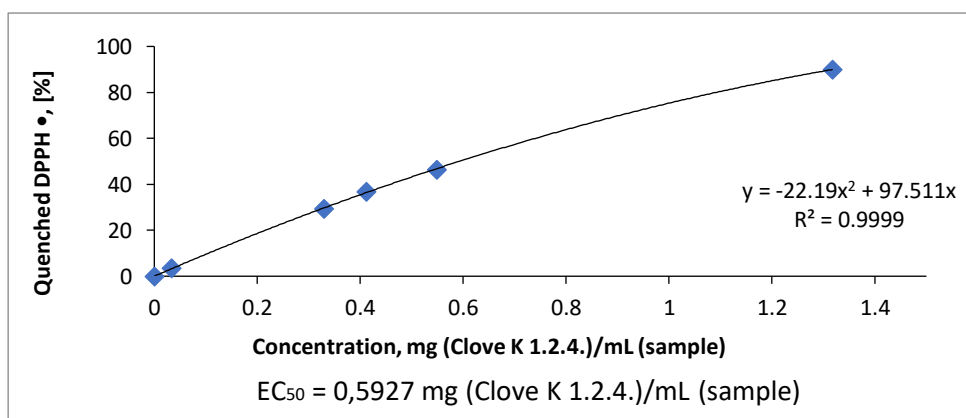
На база на получените калибровъчни криви може да се пресметне EC_{50} . Резултатите са представени с **Таблица 7.**

Таблица 7. Антиоксидантна активност на карамфиловият хидрозол 1.2.4. и 1.2.9. представена чрез EC₅₀

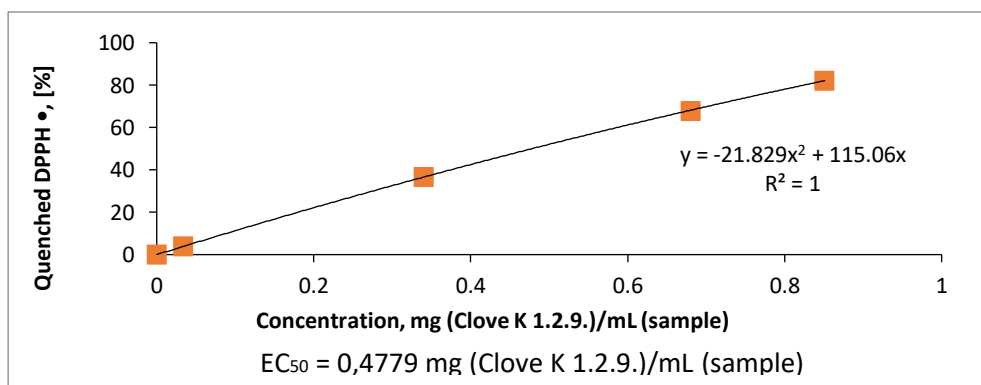
Проба	EC ₅₀ , mg (карамфиловхидрозол) / mL (проба)
Карамфилов хидрозол 1.2.4.	2.3872
Карамфилов хидрозол 1.2.9.	2.2179

На **Фигура 9.** са показани експериментални данни и калибровъчна крива на неутрализиран DPPH радикал на 60-тата минута от карамфилов казанен остатък (А) СН 1.2.4, (Б) СН 1.2.9.

(А)



(Б)



Фигура 9. Експериментални данни и калибровъчна крива на неутрализиран DPPH радикал на 60-тата минута от карамфилов казанен остатък (А) СН 1.2.4, (Б) СН 1.2.9.

На база на получените калибровъчни криви може да се пресметне EC_{50} . Резултатите са представени с **Таблица 8**.

Таблица 8. Антиоксидантна активност на карамфиловият казанен остатък 1.2.4. и 1.2.9. представена чрез EC_{50}

Проба	EC_{50} , mg (карамфиловказанен остатък) / mL (проба)
Карамфилов казанен остатък 1.2.4.	0.593
Карамфилов казанен остатък 1.2.9.	0.4779

Най-силната антиоксидантна активност има при казанния остатък 1.2.9. със стойност 0.4779mg/ml, а пък най-слабата се наблюдава при хидрозол 1.2.4. със стойност 2.3872 mg/ml.

Нап и Parker също така разкриват антиоксидантна активност на масло от карамфил и неговата основна активна съставка евгенол [35].

Също така Sonia и колектив изследват етеричното масло от карамфил и установяват, че максимален антиоксидантен потенциал EC_{50} се наблюдава при концентрации между 10,87-31,63 $\mu\text{g/ml}$ [36].

6. Изводи

От проведените изследвания в настоящата дипломна работа могат да се направят следните изводи:

- Диск-дифузионният метод, използван за изследване на антибактериалната активност на етеричното масло и хидрозол на лавандула, не показва наличие на активност срещу *E. coli* K12 и *B. Subtilis* 3652;
- Методът на микроразреждане в бульон, използван за изследване на антибактериалната активност на хидрозол и казанен остатък от карамфил показва наличие на антибактериална активност спрямо щамовете.
- С помощта на използвания спектрофотометричен анализ за изследване на казанен остатък и хидрозолна карамфил се отчита наличие на антиоксидантна активност и при двата вида проби. Най-силната антиоксидантна активност има при казанния остатък 1.2.9. със стойност 0.4779 mg/ml , а пък най-слаба при хидрозол 1.2.4. със стойност 2.3872 mg/ml.

7. Заключение:

Отпадъчните фракции при парна дестилация на етерично масло от карамфил, а именно казанен остатък, хидрозол и изтощена растителна маса, оказват влияние и имат потенциал за широко приложение в различните области на съвременната индустрия.

Експериментите показани в настоящата дипломна работа, касаещи антибактериалната и антиоксидантна активност на отпадъчните фракции, показват наличие на такава и дават повод за по-нататъшни изследвания свързани с тях.

Откритията свързани с отпадъчните фракции, са подкрепени от редица учени цитирани и обсъдени по-горе в настоящата дипломна работа. Те силно подкрепят гореспоменатите резултати и затвърждават тяхното значение. Проявата на антибактериални и антиоксидантни свойства на казанен остатък и хидрозол от карамфил, са от изключително значение за справяне с различен вид патогени и с оксидативния стрес причинен от свободните радикали.

В обобщение, текущите изследвания на антибактериалните и антиоксидантните свойства на отпадъчните фракции при парна дестилация на масло от карамфил са от решаващо значение. В свят, в който заболяванията се увеличават, етеричните масла предлагат потенциални решения. Чрез изучаване на растителни екстракти учените могат да открият нови начини за борба с инфекции и намаляване на окислителното увреждане. Нашият ангажимент към тези изследвания е важен, тъй като той не само подобрява нашето разбиране за това как етеричните масла и техните отпадъчни фракции влияят на човешкото здраве, но също така помага и по-ефективни лечения. Проучването на растителен антибактериален и антиоксидантен потенциал е обещаващо за по-здрави общности и по-добра околна среда.

8. Използвана литература

- [1] Savena Dimova, Elena Kraycheva, Meriem Mollova, Teodora Nikolova, AROMATHERAPY AS ALTERNATIVE MEDICINE, Medical University of Varna, Varna Medical, 2012
- [2] Roberta Wilson, Aromatherapy: Essential Oils for Vibrant Health and Beauty
- [3] Lee, MyeongSoo; Choi, JiaeChoi (2012). "Aromatherapyforhealthcare: anoverviewofsystematicreviews". Maturitas. 3 (71): 257–260.
- [4]Batiha, G.E.S.; Beshbishy, A.A.; Tayebwa, D.S.; Shaheen, M.H.; Yokoyama, N.; Igarashi, I. Inhibitory effects of *Syzygiumaromaticum* and *Camellia sinensis* methanolic extracts on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. Ticks Tick. Borne Dis. 2019, 10, 949–958
- [5] Cortés-Rojas DF, de Souza CR, Oliveira, Clove (*Syzygiumaromaticum*): a precious spice Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X)
- [6] Qiao Hu, Meifang Zhou, Shuyongwei, Progress on the Antimicrobial Activity Research of Clove Oil and Eugenol in the Food Antisepsis Field, Food Science, 2018, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14180>
- [7] S Gaber El-SaberBatiha, Luay M. Alkazmi, Lamiaa G. Wasef ,AmanyMagdyBeshbishy ,Eman H. Nadwa ,5ORCID andEman K. Rashwan, *Syzygiumaromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities, Biomolecules 2020, <https://doi.org/10.3390/biom10020202>
- [8] Papachan Karur Sofia, Rajendra Prasad, Virendra Kumar Vijay, Ashok Kumar Srivastav, Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common food borne pathogens, Institute of food, science and technology, 2007, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01308.x>
- [9] H. J. D. Dorman, S. G. Deans, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, Journal of Applied Microbiology, 2000, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>

- [10] H. J. D. Dorman and S. G. Deans, "Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 88, no. 2, pp. 308–316, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x
- [11] Hochenegg, B. Evaluation of the traditional and well-established use of *Tormentillaerhizoma*, *Caryophylliflos* and *Caryophylliaetheroleum*. Thesis Univ. Wien Germany Uniwien 2010
- [12] Hussein, G.; Miyashiro, H.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kakiuchi, N.; Shimotohno, K. Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. *Phytother. Res.* 2000, 14, 510–516.
- [13] TEHO KOH, YUKIO MURAKAMI, SHOJI TANAKA, MAMORU MACHINO and HIROSHI SAKAGAMI, Re-evaluation of Anti-inflammatory Potential of Eugenol in IL-1 β -stimulated Gingival Fibroblast and Pulp Cells, *In Vivo*, 2013, 27 (2) 269-273
- [14] Mytle N., Anderson G., Doyle M., Smith, Antimicrobial activity of clove (*Syzygiumaromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters, *Food control*, 2006, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.008>
- [15] Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Stoilova, I.; Stoyanova, A.; Krastanov, A.; Schmidt, E. Chemical Composition and Antioxidant properties of clove leaf essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 2006, <https://doi.org/10.1021/jf060608c>
- [16] Oulkheir, S.; Aghrouh, M.; EL Mourabit, F.; Dalha, F.; Graich, H.; Amouch, F.; Ouzaid, K.; Moukale, A.; Chadli, S. Antibacterialactivityofessentialoilsextractsfromcinnamon, thyme, cloveandgeraniumagainst a gram-negativeandgram-positivepathogenicbacteria. *J. Dis. Med. Plants* 2017,doi: 10.11648/j.jdmp.s.2017030201.11
- [17] Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Sagar B. Kedare andR. P. Singh. *J Food Sci Technol.* 2011 Aug; 48(4): 412–422. Published online 2011 Feb25.doi: 10.1007/s13197-011-0251-1

- [18] Chaieb, K.; Hajlaoui, H.; Zmantar, T.; Kahla-Nakbi, A.B.; Rouabhia, M.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. *Phytother. Res.* 2007, 21, 501–506.
- [19] Gaber El-Saber Batiha, Luay M. Alkazmi , 3 Lamiaa G. Wasef, Amany Magdy Beshbishy , Eman H. Nadwa и Eman K. Rashwan 6, 7, doi: [10.3390/biom10020202](https://doi.org/10.3390/biom10020202)
- [20] David Šilha ,Karolína Švarcová ,Tomáš Bajer , Karel Královec , Eliška Tesařová , Kristýna Moučková , Marcela Pejchalová , Petra Bajerová, Chemical Composition of Natural Hydrolates and Their Antimicrobial Activity on *Arcobacter*-Like Cells in Comparison with Other Microorganisms, National center of Biotechnology information, 2020, doi: [10.3390/molecules25235654](https://doi.org/10.3390/molecules25235654)
- [21] Qiao Hu, Meifang Zhou, Shuyongwei, Progress on the Antimicrobial Activity Research of Clove Oil and Eugenol in the Food Antisepsis Field, *Food Science*, 2018, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14180>
- [22] Michael Jee (editor), *Oils and Fats Authentication: v. 1 Analytical Methods and Analysis*, (Chapter 7: "Vegetable Oil Residues"), Wiley-Blackwell; 1st edition (August 30, 2002)
- [23] Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review, МагдаленаУлановска и БеатаОлас, Department of General Biochemistry, University of Lodz, Pomorska 141/3, 90-236 Lodz, Poland, <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>
- [24] Ethos natura ,2023, <https://www.ethosnatura.com/what-is-steam-distillation-of-essential-oils/>
- [25] Mohammad-Taghi Golmakani , Mahdieh Zare, Saeedeh Razzaghi, Eugenol Enrichment of Clove Bud Essential Oil Using Different Microwave-assisted Distillation Methods, 2017, <https://doi.org/10.3136/fstr.23.385>
- [26] Tahmasb Hatami , Julio C.F. Johner , Giovani L. Zabet , M. Angela A. Meireles, Supercritical fluid extraction assisted by cold pressing from clove buds: Extraction performance, volatile oil

composition, and economic evaluation, The Journal of Supercritical Fluids, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.003>

[27] Gaber El-Saber Batiha, Luay M. Alkazmi , 3 Lamiaa G. Wasef, Amany Magdy Beshbishy , Eman H. Nadwa и Eman K. Rashwan 6, 7, doi: [10.3390/biom10020202](https://doi.org/10.3390/biom10020202)

[28] F. Lv, H. Liang, Q. Yuan, and C. Li, “In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms,” Food Res. Int., vol. 44, no. 9, pp. 3057–3064, 2011, doi: 10.1016/j.foodres.2011.07.030.

[29] Oyedemi SO, Okoh AI, Mabinya LV, Pirochenva G, Afolayan AJ. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. Afr J Biotechnol 2009; 8: 1280–6.

[30] Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Society Toxicol Pathol 2002;30:620–50.

[31] Jingwen Bai, Jianqiang Li , Zhiyuan Chen, Xuedong Bai, Zhenyuan Yang, Zitong Wang, Yu Yang, Antibacterial activity and mechanism of clove essential oil against foodborne pathogens, LWT,2023, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114249>

[32] Bouchentouf Salim, Ghalem Said, Missoum Nouredine, Allali Hocine, Bouchentouf Amina Angelika, A Note Study on Antidiabetic Effect of Main Molecules Contained in Clove Using Molecular Modeling Interactions with DPP-4 Enzyme, International Journal of Computational and Theoretical Chemistry, 2017, doi: 10.11648/j.ijctc.20170501.12

[33] Sameer S. Faujdar, Dakshina Bisht, Amisha Sharma, Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) against uropathogens producing ESBL, MBL, and AmpC beta-lactamase, J Family Med Prim Care, 2020, doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_908_19

[34] Jingwen Bai ,Jianqiang Li , Zhiyuan Chen, Xuedong Bai, Zhenyuan Yang, Zitong Wang, Yu Yang, Antibacterial activity and mechanism of clove essential oil against foodborne pathogens,LWT, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114249>

[35]Luay M. Alkazmi,Lamiaa G. Wasef, S Gaber El-SaberBatih ,AmanyMagdyBeshbishy ,Eman H. Nadwa ,5ORCID andEman K. Rashwan, *Syzygiumaromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities,Biomolecules 2020,<https://doi.org/10.3390/biom10020202>

[36] Kamalpreet Kaur, & Ritu Rani (2019) Chemical Composition, Antioxidant and Antifungal Potential of Clove (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil, its Major Compound and its Derivatives, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 22:5, 1195-1217, DOI: 10.1080/0972060X.2019.1688689